

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-145187

(43)Date of publication of application : 04.06.1990

(51)Int.Cl. C12N 15/13
C12N 5/10
C12P 21/08
// (C12P 21/08
C12R 1:91)

(21)Application number : 01-057675 (71)Applicant : HYBRITECH INC

(22)Date of filing : 08.03.1989 (72)Inventor : JOHNSON MARY
JACQUELINE
PHELPS JULIE
LEFEVRE

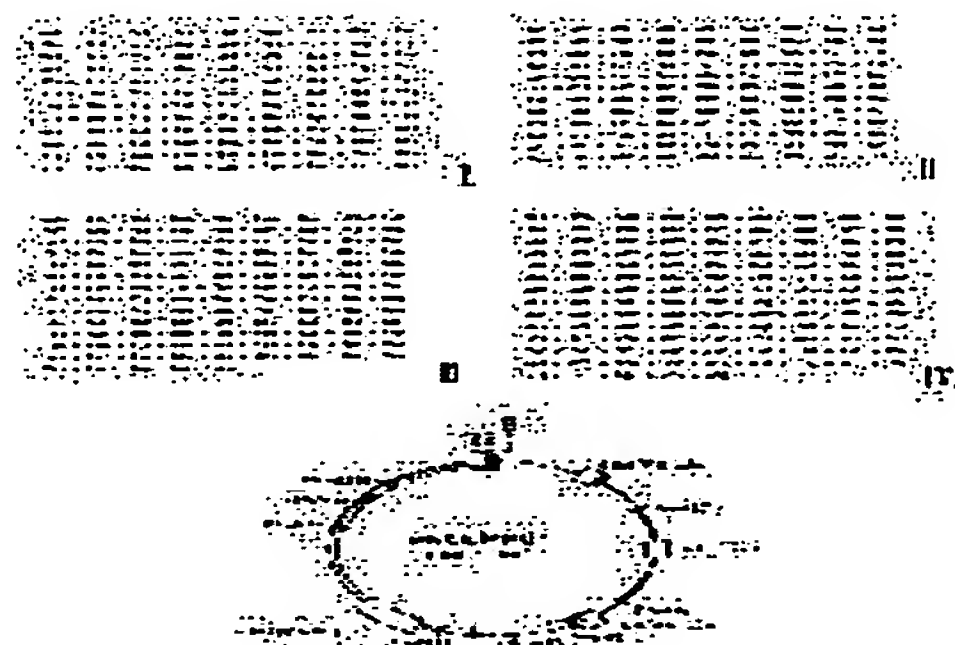
(30)Priority

Priority	88 274105	Priority	17.11.1988	Priority	US
number :		date :		country :	

(54) BIFUNCTIONAL CHIMERIC ANTIBODY

(57)Abstract:

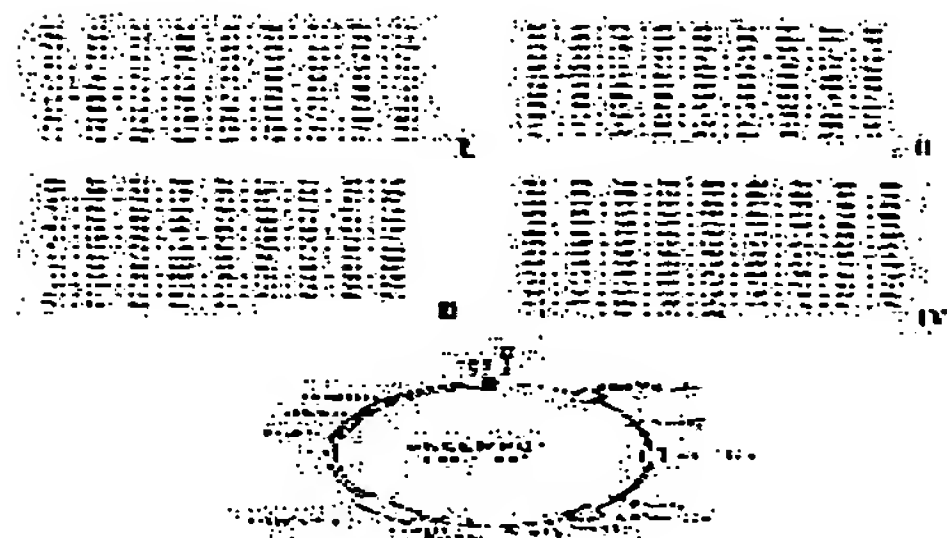
PURPOSE: To obtain a bifunctional chimeric antibody having bidimensional specificity and improved in effects for diagnosing and treating diseases by including the first and second DNA sequences encoding an L-chain variable region and an H-chain variable region, respectively, specific to a human



carcinoembryonic antigen.

CONSTITUTION: (A) A recombined DNA compound which contains the first DNA chain coding sequence of formula II encoding an amino acid sequence of formula I in a chimeric antibody L-chain variable region and the second DNA chain coding sequence encoding an amino acid

sequence of formula III in a chimeric antibody H-chain variable region is induced from a murine hybridoma. (B) The third and fourth DNA chain sequences encoding the L and H-chain constant regions of a chimeric antibody are induced from human lymphocyte. The component B is added to the component A to obtain (C) a recombined DNA compound such as a plasmid pNCEMKG1. A host cell is transformed by the component C and subsequently cultured to produce a bifunctional chimeric antibody secreting CME/CHA.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報(A) 平2-145187

⑤ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)6月4日

C 12 N 15/13

ZNA

8717-4B

C 12 N 15/00

A

8515-4B

5/00

B※

審査請求 未請求 請求項の数 31 (全38頁)

⑭ 発明の名称 2機能性キメラ抗体

⑮ 特 願 平1-57675

⑯ 出 願 平1(1989)3月8日

優先権主張 ⑰ 1988年11月17日 ⑱ 米国(US) ⑲ 274105

⑳ 発 明 者 メアリー・ジャクリ アメリカ合衆国カリフォルニア92067、ランチョ・サン
ン・ジョンソン ト・フエー、ビー・オー・ボックス3644番㉑ 発 明 者 ジュリー・レフエーブ アメリカ合衆国カリフォルニア92126、サン・ディエゴ、
ル・フェルブス ダルビー・ブレイス11264番㉒ 出 願 人 ハイブリテック・イン アメリカ合衆国92121、ステート・オブ・カリフォルニ
コーポレイテッド ア、シテイ・オブ・サン・ジエゴ、トレイアナ・ロード
11095番

㉓ 代 理 人 弁理士 青山 葆 外1名

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

2機能性キメラ抗体

2. 特許請求の範囲

1. キメラモノクローナル抗体のヒト癌胎児性

抗原に特異的なL鎖可変領域をコードしている第

1のDNA配列、およびキメラモノクローナル抗

体のヒト癌胎児性抗原に特異的なH鎖可変領域を

コードしている第2のDNA配列を含有する組換

えDNA化合物であって、該抗体L鎖可変領域ア

ミノ酸配列が、式：

Asp - Ile - Val - Met - Thr - Gln - Ser - Gln - Lys
 Phe - Met - Ser - Thr - Ser - Val - Gly - Asp - Arg
 Val - Ser - Ile - Thr - Cys - Lys - Ala - Ser - Gln
 Asn - Val - Arg - Thr - Ala - Val - Ala - Trp - Tyr
 Gln - Gln - Lys - Pro - Gly - Gln - Ser - Pro - Lys
 Ala - Leu - Ile - Tyr - Leu - Ala - Ser - Asn - Arg
 Tyr - Thr - Gly - Val - Pro - Asp - Arg - Phe - Thr
 Gly - Ser - Gly - Ser - Gly - Thr - Asp - Phe - Thr
 Leu - Thr - Ile - Thr - Asn - Val - Gln - Ser - Glu
 Asp - Leu - Ala - Asp - Tyr - Phe - Cys - Leu - Gln
 His - Trp - Asn - Tyr - Pro - Leu - Thr - Phe - Gly
 Ala - Gly - Thr - Lys - Leu - Gln - Leu - Lys - Arg

で示されるアミノ酸配列を含有し、該抗体H鎖可

変領域アミノ酸配列が、式：

Asp - Val - Gln - Leu - Val - Glu - Ser - Gly - Gly
 Gly - Leu - Val - Gln - Pro - Gly - Gly - Ser - Arg
 Lys - Leu - Ser - Cys - Ala - Ala - Ser - Gly - Phe
 Thr - Phe - Ser - Asn - Phe - Gly - Met - His - Trp
 Ile - Arg - Gln - Ala - Pro - Glu - Lys - Gly - Leu
 Glu - Trp - Val - Ala - Tyr - Ile - Ser - Gly - Gly
 Ser - Ser - Thr - Ile - Tyr - Tyr - Ala - Asp - Thr
 Val - Lys - Gly - Arg - Phe - Thr - Ile - Ser - Arg
 Asp - Asn - Pro - Arg - Asn - Thr - Leu - Phe - Leu
 Gln - Met - Thr - Ser - Leu - Arg - Ser - Glu - Asp
 Thr - Ala - Met - Phe - Tyr - Cys - Ala - Arg - Asp
 Tyr - Tyr - Ala - Asn - Asn - Tyr - Trp - Tyr - Phe
 Asp - Val - Trp - Gly - Ala - Gly - Thr - Thr - Val
 Thr - Val - Ser - Ser - Ala

で示されるアミノ酸配列を含有するものである組

換えDNA化合物。

2. 第1のDNA鎖略号配列が、式：

GAC - ATT - GTG - ATG - ACC - CAG - TCT - CAA - AAA
 TTC - ATG - TCC - ACA - TCA - GTA - GGA - GAC - AGG
 GTC - ACC - ATC - ACC - TGC - AAG - GCC - AGT - CAG
 AAT - GTT - CGT - ACT - GCT - GTT - GCC - TGG - TAT
 CAA - CAG - AAA - CCA - GGG - CAG - TCT - CCT - AAA
 GCA - CTG - ATT - TAC - TTG - GCA - TCC - AAC - CGG
 TAC - ACT - GGA - GTC - CCT - CAT - CGC - TTC - ACA
 GGC - AGT - GGA - TCT - GGG - ACA - CAT - TTC - ACT
 CTC - ACC - ATT - ACC - AAT - GTG - CAA - TCT - GAA
 GAC - CTG - GCA - GAT - TAT - TTC - TGT - CTG - CAA
 CAT - TGG - AAT - TAT - CCG - CTC - ACG - TTC - GGT
 GCT - GGG - ACC - AAG - CTG - GAG - CTG - AAA - CGG

で示されるDNA配列を含有し、第2のDNA鎖暗号配列が、式：

GAT - GTG - CAG - CTG - GTG - GAG - TCT - GGG - GGA
GGC - TTA - GTG - CAG - CCT - GGA - GCG - TCC - CGG
AAA - CTC - TCC - TGT - GCA - GCC - TCT - GGA - TTC
ACT - TTC - AGT - AAC - TTT - GGA - ATG - CAC - TGG
ATT - CGT - CAG - GCT - CCA - GAG - AAG - GGA - CTG
GAG - TGG - GTC - GCA - TAC - ATT - AGT - GGT - GGC
AGT - AGT - ACC - ATC - TAC - TAT - GCA - GAC - ACA
GTG - AAG - GGC - CGA - TTC - ACC - ATC - TCC - AGA
GAC - AAT - CCC - AGG - AAC - ACC - CTC - TTC - CTG
CAA - ATG - ACC - AGT - CTA - AGG - TCT - GAG - GAC
ACG - GCC - ATG - TTT - TAC - TGT - GCA - AGA - GAT
TAC - TAC - GCT - AAC - AAC - TAC - TGG - TAC - TTC
GAT - GTC - TGG - GGC - GCA - GGG - ACC - ACG - GTC
ACC - GTC - TCC - TCA - GCC

で示されるDNA配列を含有する請求項1に記載の組換えDNA化合物。

3. キメラモノクローナル抗体のL鎖定常領域をコードしている第3のDNA鎖配列、およびキメラモノクローナル抗体のH鎖定常領域をコードしている第4のDNA鎖配列をさらに含有する請求項1または請求項2に記載の組換えDNA化合物。

4. 第1および第2のDNA鎖暗号配列がネズ

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser
Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr
Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln
Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly
Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr
Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Arg Tyr Phe Cys Ala
Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr
Lys Leu Thr Val Leu Gly

で示されるアミノ酸配列を含有し、該抗体H鎖可変領域アミノ酸配列が、式：

Glu Val Thr Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Ser Val Lys
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
Phe Thr Leu Ser Gly Glu Thr Met Ser Trp Val Arg Gln
Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Thr Leu
Ser Gly Gly Gly Phe Thr Phe Tyr Ser Ala Ser Val Lys
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Asn Asn
Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser His Arg Phe Val His Trp
Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala

で示されるアミノ酸配列を含有するものである組換えDNA化合物。

10. 第1のDNA鎖暗号配列が、式：

ミハイブリドーマから誘導されたものである請求項1、請求項2または請求項3のいずれかに記載の組換えDNA化合物。

5. ネズミハイブリドーマがCEM231.6.

7である請求項4に記載の組換えDNA化合物。

6. 第3および第4のDNA鎖暗号配列がヒトリンパ球から誘導されたものである請求項3に記載の組換えDNA化合物。

7. 第5図に示されるプラスミドpNC EMKG1である請求項6に記載の組換えDNA化合物。

8. プラスミドpNC EMKG1(E-)である請求項6に記載の組換えDNA化合物。

9. キメラモノクローナル抗体のキレート特異的L鎖可変領域をコードしている第1のDNA配列、およびキメラモノクローナル抗体のキレート特異的H鎖可変領域をコードしている第2のDNA配列を含有する組換えDNA化合物であって、該抗体L鎖可変領域アミノ酸配列が、式：

CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT GCA CTC ACC ACA TCA
CCT GGT GAA ACA GTC ACA CTC ACT TGT CGC TCA AGT ACT
GGG GCT GTT ACA ACT AGT AAC TAT GCC AAC TGG GTC CAA
GAA AAA CCA GAT CAT TTA TTC ACT GGT CTA ATA GGT GGT
ACC AAT AAC CGG GCT CCA GGT GTT CCT GCC AGA TTC TCA
GGC TCC CTG ATT GGA GAC AAG GCT GCC CTC ACC ATC ACA
GGG GCA CAG ACT GAA GAT GAG GCA AGA TAT TTC TGT GCT
CTA TGG TAC ACC AGC CTC TGG GTA TTC GGT GGA GGA ACC
AAA CTG ACT GTC CTA GGG

で示されるDNA配列を含有し、第2のDNA鎖暗号配列が、式：

GAA GTG ACG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GAC TCA GTG AAG
CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA
TTC ACT TTA AGT GGT GAA ACC ATG TCT TGG GTT CGC CAG
ACT CCG GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA ACC ACT CTT
AGT GGT GGT GGT TTC ACC TTC TAT TCA GCC AGT GTG AAG
GGT CGT TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC CAG AAC AAC
CTC TAT CTA CAA CTG AAT AGT CTG AGC TCT CAG GAC ACC
GCC TTG TAT TTC TGT CCA AGT CAT CGG TTT GTT CAC TGG
GGC CAC GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA GCC

で示されるDNA配列を含有する請求項9に記載の組換えDNA化合物。

11. キメラモノクローナル抗体のL鎖定常領域をコードしている第3のDNA鎖配列、およびキメラモノクローナル抗体のH鎖定常領域をコードしている第4のDNA鎖配列をさらに含有する

請求項9または請求項10に記載の組換えDNA化合物。

12. 第1および第2のDNA鎖暗号配列がネズミハイブリドーマから誘導されたものである請求項9、請求項10または請求項11のいずれかに記載の組換えDNA化合物。

13. ネズミハイブリドーマがCHA255.5である請求項12に記載の組換えDNA化合物。

14. 第3および第4のDNA鎖暗号配列がヒトリンパ球から誘導されたものである請求項11に記載の組換えDNA化合物。

15. 第10図に示されるプラスミドpGCHAKG1である請求項14に記載の組換えDNA化合物。

16. プラスミドpGCHAKG1(E-)である請求項14に記載の組換えDNA化合物。

17. プラスミドpGCHAKG1-2である請求項14に記載の組換えDNA化合物。

18. プラスミドpGCHAKG1-3である請求項14に記載の組換えDNA化合物。

27. SP2/0/pNCEMKG1(E-)/pGCHAKG1-3である請求項19に記載の宿主細胞。

28. ある1つのL鎖可変領域および対応するある1つのH鎖可変領域が第1の抗原を特異的に認識するL鎖およびH鎖可変領域を含有し、別のL鎖可変領域および対応する別のH鎖可変領域が第2の異なる抗原を特異的に認識するL鎖およびH鎖可変領域を含有し、さらに、すべてのL鎖およびH鎖定常領域がヒト抗体定常領域を含有している2機能性キメラモノクローナル抗体。

29. ある1つのL鎖可変領域および対応するある1つのH鎖可変領域がヒト癌胎児性抗原を特異的に認識するL鎖およびH鎖可変領域を含有し、別のL鎖可変領域および対応する別のH鎖可変領域が金属キレートの特異的に認識するL鎖およびH鎖可変領域を含有し、さらに、すべてのL鎖およびH鎖定常領域がヒト抗体定常領域を含有している請求項28に記載の2機能性キメラモノクローナル抗体。

19. 2機能性キメラCEM/CHAを分泌する形質転換された宿主細胞。

20. SP2/0/pNCEMKG1/pGCHAKG1である請求項19に記載の宿主細胞。

21. SP2/0/pNCEMKG1/pGCHAKG1(E-)である請求項19に記載の宿主細胞。

22. SP2/0/pNCEMKG1/pGCHAKG1-2である請求項19に記載の宿主細胞。

23. SP2/0/pNCEMKG1/pGCHAKG1-3である請求項19に記載の宿主細胞。

24. SP2/0/pNCEMKG1(E-)/pGCHAKG1である請求項19に記載の宿主細胞。

25. SP2/0/pNCEMKG1(E-)/pGCHAKG1(E-)である請求項19に記載の宿主細胞。

26. SP2/0/pNCEMKG1(E-)/pGCHAKG1-2である請求項19に記載の宿主細胞。

30. ヒト癌胎児性抗原を認識するL鎖可変領域がアミノ酸配列：

Asp - Ile - Val - Met - Thr - Glu - Ser - Gln - Lys
Phe - Met - Ser - Thr - Ser - Val - Gly - Asp - Arg
Val - Ser - Ile - Thr - Cys - Lys - Ala - Ser - Gln
Asn - Val - Arg - Thr - Ala - Val - Ala - Trp - Tyr
Gln - Gln - Lys - Pro - Gly - Gln - Ser - Pro - Lys
Ala - Leu - Ile - Tyr - Leu - Ala - Ser - Asn - Arg
Tyr - Thr - Gly - Val - Pro - Asp - Arg - Phe - Thr
Gly - Ser - Gly - Ser - Gly - Thr - Asp - Phe - Thr
Leu - Thr - Ile - Thr - Asn - Val - Gln - Ser - Glu
Asp - Leu - Ala - Asp - Tyr - Phe - Cys - Leu - Gln
His - Trp - Asn - Tyr - Pro - Leu - Thr - Phe - Gly
Ala - Gly - Thr - Lys - Leu - Glu - Leu - Lys - Arg

を含有し、ヒト癌胎児性抗原を認識するH鎖可変領域がアミノ酸配列：

(以下余白)

Asp - Val - Gln - Leu - Val - Glu - Ser - Gly - Gly
 Gly - Leu - Val - Gln - Pro - Gly - Gly - Ser - Arg
 Lys - Leu - Ser - Cys - Ala - Ala - Ser - Gly - Phe
 Thr - Phe - Ser - Asn - Phe - Gly - Met - His - Trp
 Ile - Arg - Gln - Ala - Pro - Glu - Lys - Gly - Leu
 Glu - Trp - Val - Ala - Tyr - Ile - Ser - Gly - Gly
 Ser - Ser - Thr - Ile - Tyr - Tyr - Ala - Asp - Thr
 Val - Lys - Gly - Arg - Phe - Thr - Ile - Ser - Arg
 Asp - Asn - Pro - Arg - Asn - Thr - Leu - Phe - Leu
 Glu - Met - Thr - Ser - Leu - Arg - Ser - Glu - Asp
 Thr - Ala - Met - Phe - Tyr - Cys - Ala - Arg - Asp
 Tyr - Tyr - Ala - Asn - Asn - Tyr - Trp - Tyr - Phe
 Asp - Val - Trp - Gly - Ala - Gly - Thr - Thr - Val
 Thr - Val - Ser - Ser - Ala

を含有し、金属キレートを認識するL鎖可変領域

がアミノ酸配列：

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser
 Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr
 Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln
 Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly
 Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr
 Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Arg Tyr Phe Cys Ala
 Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr
 Lys Leu Thr Val Leu Gly

を含有し、金属キレートを認識するH鎖可変領域

がアミノ酸配列：

従来技術とその課題

モノクローナル抗体は、インビトロにおいてはイムノアッセイでの利用、およびインビボにおいては疾患の診断および治療にと、両分野においてますます重要性を増しつつある。ヒト癌胎児性抗原(CEA)に対するモノクローナル抗体は、結腸直腸癌や乳癌などのある種の癌腫に関連する腫瘍のインビボイメージングおよび治療にとくに有用である。臨床面への適用に応じて、これらのモノクローナル抗体は、一般に放射性核種、薬物またはトキシン(毒素)と結合(コンジュゲート)されるものである。

しかしながら、最も利用可能なモノクローナル抗体は、ネズミ、即ちマウスのハイブリドーマから導かれる。インビトロでのイムノアッセイにネズミ抗体を適用することには、血清成分とネズミ免疫グロブリンとの反応による偽陽性結果を伴うという問題が起こり得る。また、さらに重要なことは、ネズミ抗体のヒト用医薬中へのインビボ適用は、それに固有の免疫原性によってしばしば制

Glu Val Thr Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Ser Val Lys
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 Phe Thr Leu Ser Gly Glu Thr Met Ser Trp Val Arg Gln
 Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Thr Leu
 Ser Gly Gly Gly Phe Thr Phe Tyr Ser Ala Ser Val Lys
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Asn Asn
 Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
 Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser His Arg Phe Val His Trp
 Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala

を含有する請求項29に記載の2機能性キメラモノクローナル抗体。

ノクローナル抗体。

31. 2機能性キメラCEM/CHAである請求項30に記載の2機能性キメラモノクローナル抗体。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、ヒト癌胎児性抗原および金属キレートに対するモノクローナル2機能性抗体に関するものである。さらに詳しくは、本発明は、インビトロおよびインビボでの利用のための、上記抗原に対する新規な2機能性キメラモノクローナル抗体、および該抗体をコードしているDNA構築物に関するものである。

限されるということである。ネズミ抗体の適用は、多くの患者で免疫応答を誘発し、多数回投与治療の間に抗体の効果が徐々に減少してしまう。この効果減少の原因は、少なくとも部分的には、循環系からの迅速なクリアランス(清掃)、または患者の免疫応答によるネズミ抗体の薬物動態学的性質の変化にあるとすることができる。したがって、ネズミモノクローナル抗体は関連の免疫原性により、長期的な複数回投与から除外されることとなり、実質上、その潜在的な治療上の価値は打撃を受ける。ヒトモノクローナル抗体を臨床使用すると、ネズミモノクローナル抗体の使用に伴う制限を克服し得ることが示唆されている。しかし、腫瘍関連抗原、例えばヒト癌胎児性抗原に対する所望の特異性および親和性を有するヒトモノクローナル抗体は、その製造が技術的に困難である。

課題を解決するための手段

1つの種から導かれた抗体の結合領域すなわち可変領域と、別の種から導かれた抗体の定常領域とが結合しているキメラ抗体が、組換えDNA法

で構築されている。キメラ抗体は、たとえば、ヨーロッパ特許公開第173494号；ショーら(Shaw)、ジャーナル・オブ・イムノ.(J. Immun.)、138:4534(1987)；サンら(Sun L. K.)、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズUSA(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、84:214-218(1987)；ニューバーガーら(Neuberger, M. S.)、ネイチャー(Nature)、314:268(1985)；ボーリアンら(Boulianne, G. L.)、ネイチャー、312:643-646(1984)；およびモリソンら(Morrison, S. L.)、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズUSA、81:6851-6855(1984)に記載されている。通常は、ネズミ抗体の可変領域とヒト抗体の定常領域とが結合されている。そのようなキメラ抗体の大部分はヒト成分であるために、実質上、ネズミ抗体よりも免疫原性が低いと考えられる。したがって、インビボでの適用にはキメラモノクローナル抗体

は急速に患者システムを通り抜けるので、2機能性抗体が結合した腫瘍部位のイメージングが増強される。

本発明は、具体的には、ある1つのL鎖およびH鎖がCEAを認識すると共に、別のL鎖およびH鎖が金属キレートを認識するキメラ2機能性抗体を提供するものである。本発明の2機能性キメラ抗体の金属キレートと特異的に結合するL鎖およびH鎖可変領域は、モノクローナル抗体CHA255[レードン(Reardon)らのネイチャー316:265-268(1985)に開示されている]から誘導された。このCHA255抗体は、インジウム(III)のEDTAキレートと最も効率良く結合するが、鉄(II)およびカドミウム(II)のEDTAキレートをも認識するものである。

2機能性かつキメラの抗体についての一般的な概念は記載されているが、前もって定める興味ある抗原、特にヒト癌胎児性抗原および金属キレートに対する特異性、ならびにアミノ酸配列が定義されている(分かっている)可変領域を有する新

が極めて望ましい。

キメラ抗体の構築の重要性に加え、さらに2機能性抗体を構築することが望ましい。2機能性抗体は、第1の特異的抗原を認識する1つの抗体由来のL鎖(軽鎖)およびH鎖(重鎖)を、第2の特異的抗原を認識する別の抗体由来のL鎖およびH鎖と共に含有している抗体である。このような二元性の特異性を有する抗体は、病的状態を予測、診断および治療する上で非常に有用である。たとえば、2機能性抗体のL鎖およびH鎖の1つの組が腫瘍関連抗原を認識するとともに、対応するL鎖およびH鎖が金属キレートを認識する場合、この2機能性抗体は腫瘍のイメージングおよび治療に使用することができる。

この2機能性抗体を患者の身体に導入すると、抗体の1部分のL鎖およびH鎖は腫瘍関連抗原に特異的に結合する。金属キレートを患者身体に導入すると、2機能性抗体の金属キレートと結合するアームが反応し得る抗原の量を知ることができる。非常に小さな分子である遊離の金属キレート

規な2機能性キメラ抗体の開発が必要とされている。さらに、新規な2機能性キメラ抗体を構成するL鎖およびH鎖可変領域をコードする定義されたDNA暗号配列を有するDNA構築物であって、真核性細胞内でこれらの新規な2機能性キメラタンパク質を発現することができるDNA構築物の開発が要望されている。本発明は、これらの要望に応えるものである。

本明細書に開示し、特許請求する発明の目的に従い、下記のとおり用語を定義する。

「A」-デオキシアデノシン。

「Ala」-アラニン残基。

「Ap^r」-アンピシリン耐性表現型またはそれを付与する遺伝子。

「Arg」-アルギニン残基。

「Asn」-アスパラギン残基。

「Asp」-アスパラギン酸残基。

「2機能性抗体」-第1の抗原と特異的に反応するL鎖可変領域およびH鎖可変領域を、第2の異なる抗原と特異的に反応するL鎖可変領域およ

びH鎖可変領域と共に含有する抗体。

「C」ーデオキシシトシン。

「キメラ抗体」ーある1つの種、通常はマウス由来の可変領域であって、別の異なる種、通常はヒト由来の定常領域に結合している該可変領域を含有する抗体。

「Cys」ーシステイン残基。

「G」ーデオキシグアノシン。

「Gln」ーグルタミン残基。

「Glu」ーグルタミン酸残基。

「Gly」ーグリシン残基。

「G418^r」ーG418耐性表現型またはそれを付与する遺伝子。「Km^r」として定義されていることもある。

「His」ーヒスチジン残基。

「Ile」ーイソロイシン残基。

「IVS」ーイントロンをコードしているDNAであり、「介在配列」とも呼ばれる。

「Lys」ーリジン残基。

「Met」ーメチオニン残基。

「レプリコン」ープラスミドまたは他のベクターの自律的な複製を調節し、それを可能にするDNA配列。

「制限フラグメント」ー1つまたはそれ以上の制限エンドヌクレアーゼ酵素の作用によって生成される線状DNA配列。

「感受性宿主細胞」ーある特定の抗生物質または他の毒性化合物の存在下では、それに対する耐性を付与するDNAセグメントが無ければ増殖できない宿主細胞。

「Ser」ーセリン残基。

「構造遺伝子」ー機能的ポリペプチドをコードしているDNA配列であって、翻訳開始および終止シグナルをも含むDNA配列。

「T」ーデオキシチミジン

「Tc^r」ーテトラサイクリン耐性表現型またはそれを付与する遺伝子。

「Thr」ースレオニン残基。

「Trp」ートリプトファン残基。

「Tyr」ーチロシン残基。

「MoAB」ーモノクローナル抗体。

「形成期タンパク質(nascent protein)」ー翻訳後改変(post-translational modification)以前に、mRNA転写体の翻訳時に調製されるポリペプチド。

「pA」ーポリアダニル化シグナルをコードしているDNA配列。

「Phe」ーフェニルアラニン残基。

「Pro」ープロリン残基

「プロモーター」ーDNAのRNAへの転写を指令するDNA配列。

「組換えDNAクローニングベクター」ー1つまたはそれ以上の付加的なDNAセグメントを追加できるか、あるいは既にそれが追加されているDNA分子を含有する自律的に複製可能な物質であり、これには例えばプラスミドまたはファージを挙げることができるが、これらに限定されない。

「組換えDNA発現ベクター」ープロモーターが組み込まれている組換えDNAクローニングベクター。

「Val」ーバリン残基。

第1図は、プラスミドpMLCE-10およびプラスミドpHFK-1の制限部位および機能地図である。この開示目的に照らし、図面は等尺で描いていない。

第2図は、プラスミドpHKCE-10およびプラスミドpGCEMKの制限部位および機能地図である。

第3図は、プラスミドpMHCE-30およびプラスミドpHG12の制限部位および機能地図である。

第4図は、プラスミドpHGCEM-30およびプラスミドpNCEMG1の制限部位および機能地図である。

第5図は、プラスミドpNCEMG1の制限部位および機能地図である。

第6図は、プラスミドpMLCH1およびpMLCH1dBの制限部位および機能地図である。

第7図は、プラスミドpGCHAKの制限部位および機能地図である。

第8図は、プラスミドpUCVHI-ne-1AおよびpHGI-CHAの制限部位および機能地図である。

第9図は、プラスミドpGCHAGIの制限部位および機能地図である。

第10図は、プラスミドpGCHAKGIの制限部位および機能地図である。

本発明は、ある1つのL鎖可変領域および対応するある1つのH鎖可変領域がヒト癌胎児性抗原を特異的に認識するL鎖およびH鎖可変領域を含有し、かつ別のL鎖可変領域および対応する別のH鎖可変領域が金属キレートの特異的に認識するL鎖およびH鎖可変領域を含有し、さらに、すべてのL鎖およびH鎖の定常領域がヒト定常領域を含有している2機能性キメラモノクローナル抗体(および該抗体をコードしているDNA化合物)である。ヒト癌胎児性抗原を認識するこの2機能性キメラモノクローナル抗体L鎖可変領域は、以下に記載のアミノ酸配列と実質的に同じアミノ酸配列を有している：

Asp - Val - Gln - Leu - Val - Glu - Ser - Gly - Gly
Gly - Leu - Val - Gln - Pro - Gly - Gly - Ser - Arg
Lys - Leu - Ser - Cys - Ala - Ala - Ser - Gly - Phe
Thr - Phe - Ser - Asn - Phe - Gly - Met - His - Trp
Ile - Arg - Gln - Ala - Pro - Glu - Lys - Gly - Leu
Glu - Trp - Val - Ala - Tyr - Ile - Ser - Gly - Gly
Ser - Ser - Thr - Ile - Tyr - Tyr - Ala - Asp - Thr
Val - Lys - Gly - Arg - Phe - Thr - Ile - Ser - Arg
Asp - Asn - Pro - Arg - Asn - Thr - Leu - Phe - Leu
Gln - Met - Thr - Ser - Leu - Arg - Ser - Glu - Asp
Thr - Ala - Met - Phe - Tyr - Cys - Ala - Arg - Asp
Tyr - Tyr - Ala - Asn - Asn - Tyr - Trp - Tyr - Phe
Asp - Val - Trp - Gly - Ala - Gly - Thr - Thr - Val
Thr - Val - Ser - Ser - Ala。

金属キレートを認識する2機能性キメラモノクローナル抗体L鎖可変領域は、以下に記載のアミノ酸配列と実質的に同じアミノ酸配列を有している：

Gln Ala Val Val Thr Gln Gln Ser Ala Leu Thr Thr Ser
Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr
Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln
Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly
Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr
Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Arg Tyr Phe Cys Ala
Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr
Lys Leu Thr Val Leu Gly。

金属キレートを認識する2機能性キメラモノク

Asp - Ile - Val - Met - Thr - Gln - Ser - Gln - Lys
Phe - Met - Ser - Thr - Ser - Val - Gly - Asp - Arg
Val - Ser - Ile - Thr - Cys - Lys - Ala - Ser - Gln
Asn - Val - Arg - Thr - Ala - Val - Ala - Trp - Tyr
Gln - Gln - Lys - Pro - Gly - Gln - Ser - Pro - Lys
Ala - Leu - Ile - Tyr - Leu - Ala - Ser - Asn - Arg
Tyr - Thr - Gly - Val - Pro - Asp - Arg - Phe - Thr
Gly - Ser - Gly - Ser - Gly - Thr - Asp - Phe - Thr
Leu - Thr - Ile - Thr - Asn - Val - Gln - Ser - Glu
Asp - Leu - Ala - Asp - Tyr - Phe - Cys - Leu - Gln
His - Trp - Asn - Tyr - Pro - Leu - Thr - Phe - Gly
Ala - Gly - Thr - Lys - Leu - Glu - Leu - Lys - Arg。

ヒト癌胎児性抗原を認識する2機能性キメラモノ

クローナル抗体H鎖可変領域は、以下に記載のアミノ酸配列と実質的に同じアミノ酸配列を有している：

(以下余白)

クローナル抗体H鎖可変領域は、以下に記載のアミノ酸配列と実質的に同じアミノ酸配列を有している：

Glu Val Thr Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Ser Val Lys
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
Phe Thr Leu Ser Gly Glu Thr Met Ser Trp Val Arg Gln
Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Thr Leu
Ser Gly Gly Gly Phe Thr Phe Tyr Ser Ala Ser Val Lys
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Asn Asn
Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser His Arg Phe Val His Trp
Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala。

本発明の化合物は、組換え2機能性キメラモノクローナル抗体CEM/CHAを表すものである。DNA塩基対の相補性により、二重鎖のDNA分子の一本鎖の配列を描けば、向かい合った鎖の配列を決定するのに十分である。ヒト癌胎児性抗原を認識する2機能性キメラモノクローナル抗体L鎖可変領域をコードしている遺伝子のヌクレオチド配列は、式：

(以下余白)

GAC - ATT - GTG - ATG - ACC - CAG - TCT - CAA - AAA
 TTC - ATG - TCC - ACA - TCA - GTA - GGA - GAC - AGG
 GTC - AGC - ATC - ACC - TGC - AAG - GCC - AGT - CAG
 AAT - GTT - CGT - ACT - GCT - GTT - GCC - TGG - TAT
 CAA - CAG - AAA - CCA - GGG - CAG - TCT - CCT - AAA
 GCA - CTG - ATT - TAC - TTG - GCA - TCC - AAC - CGG
 TAC - ACT - GGA - GTC - CCT - GAT - CGC - TTC - ACA
 GGC - AGT - GGA - TCT - CGG - ACA - GAT - TTC - ACT
 CTC - ACC - ATT - ACC - AAT - GTG - CAA - TCT - GAA
 GAC - CTG - GCA - GAT - TAT - TTC - TGT - CTG - CAA
 CAT - TGG - AAT - TAT - CCG - CTC - ACC - TTC - GGT
 GCT - GGG - ACC - AAG - CTG - GAG - CTG - AAA - CGG

で示される。

ヒト癌胎児性抗原を認識する2機能性キメラモノクローナル抗体H鎖可変領域をコードしている遺伝子のヌクレオチド配列は、式：

GAT - GTG - CAG - CTG - CTG - GAG - TCT - CGG - GGA
 GGC - TTA - GTG - CAG - CCT - GGA - GGG - TCC - CGG
 AAA - CTC - TCC - TGT - GCA - GCC - TCT - GGA - TTC
 ACT - TTC - AGT - AAC - TTT - GGA - ATG - CAC - TGG
 ATT - CGT - CAG - GCT - CCA - GAG - AAG - GGA - CTG
 GAG - TGG - GTC - GCA - TAC - ATT - AGT - GGT - GCC
 AGT - AGT - ACC - ATC - TAC - TAT - GCA - GAC - ACA
 GTG - AAG - GGC - CGA - TTC - ACC - ATC - TCC - AGA
 GAC - AAT - CCC - AGG - AAC - ACC - CTC - TTC - CTG
 CAA - ATG - ACC - AGT - CTA - AGG - TCT - GAG - GAC
 ACG - GCC - ATG - TTT - TAC - TGT - GCA - AGA - GAT
 TAC - TAC - GCT - AAC - AAC - TAC - TGG - TAC - TTC
 GAT - GTC - TGG - GGC - GCA - GGG - ACC - ACG - GTC
 ACC - GTC - TCC - TCA - GCC

で示される。

本発明の新規なDNA化合物は、2つの別のハイブリドーマセルラインから調製されるゲノムDNAクローンから誘導される。ヒト癌胎児性抗原を認識する免疫グロブリン鎖を発現するL鎖およびH鎖可変領域遺伝子を、ハイブリドーマCEM231.6.7のゲノムDNAライブラリーからクローンした。ネズミハイブリドーマCEM231.6.7は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ロックビレ、メリーランド(American Type Culture Collection, Rockville, MD)のパーマネント・ストック・カルチャー・コレクションの一部であり、受託番号ATCC HB9620の下で入手可能である。金属キレートを認識する免疫グロブリン鎖を発現するL鎖およびH鎖可変領域遺伝子を、ハイブリドーマCHA255.5のゲノムDNAライブラリーからクローンした。ネズミハイブリドーマCHA255.5は、レードンらのネイチャー316:265-268(1985)に開示されている。ネズミハ

で示される。

金属キレートを認識する2機能性キメラモノクローナル抗体L鎖可変領域をコードしている遺伝子のヌクレオチド配列は、式：

CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT GCA CTC ACC ACA TCA
 CCT GGT GAA ACA GTC ACA CTC ACT TGT CGC TCA AGT ACT
 GGG GCT GTT ACA ACT AGT AAC TAT GCC AAC TGG GTC CAA
 GAA AAA CCA GAT CAT TTA TTC ACT GGT CTA ATA GGT GGT
 ACC AAT AAC CGG GCT CCA GGT GTT CCT GCC AGA TTC TCA
 GGC TCC CTG ATT GGA GAC AAG GCT GCC CTC ACC ATC ACA
 GGG GCA CAG ACT GAA GAT CAG GCA AGA TAT TTC TGT GCT
 CTA TGG TAC AGC AAC CTC TGG GTA TTC GGT GGA GGA ACC
 AAA CTG ACT GTC CTA GGG

で示される。

金属キレートを認識する2機能性キメラモノクローナル抗体H鎖可変領域をコードしている遺伝子のヌクレオチド配列は、式：

GAA GTG ACG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GAC TCA GTG AAG
 CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GCA
 TTC ACT TTA AGT GGT GAA ACC ATG TCT TGG GTT CGC CAG
 ACT CCG GAG AAG AGG CTG CAG TGG GTC GCA ACC ACT CTT
 AOT GGT GGT GGT TTC ACC TTC TAT TCA GCC AGT GTG AAG
 GGT GGT TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC CAG AAC AAC
 CTC TAT CTA CAA CTG AAT AGT CTG AGG TCT CAG GAC ACG
 GCC TTG TAT TTC TGT GCA AGT CAT CGG TTT GTT CAG TGG
 GGC CAC GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA GCC

イブリドーマCHA255.5はさらに、メアレス(Meares)およびデイビット(David)の米国特許第4,722,892号[1988年2月2日発行]にも開示されている。すべてのL鎖およびH鎖のヒト定常領域をコードしている遺伝子構築物をヒト赤血球細胞から誘導された遺伝子ライブラリーからクローンした。本発明は、大量の2機能性キメラ抗体を生物学的に生産することができるという、メディカルサイエンスにとって必要とされる利益を初めて提供するものである。

プラスミドpMLCE-10は、ヒト癌胎児性抗原を認識する、モノクローナル抗体CEMのL鎖可変領域のゲノム配列を含有している。プラスミドpMLCE-10は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ロックビレ、メリーランド(American Type Culture Collection, Rockville, MD)のパーマネント・コレクションの一部であり(1988年3月4日寄託)、受託番号ATCC 67639の下で入手可能である。プラスミドpHKF-1は、ヒト抗体のL鎖

定常領域のゲノム配列を含有する。プラスミドpHKF-1は、ATCCパーマネント・コレクションの一部である(1988年3月4日寄託、受託番号ATCC 67637)。プラスミドpMLCE-10およびpHKF-1の制限部位および機能地図を添付の第1図に示す。

プラスミドpHKCE-10を、プラスミドpMLCE-10由来のCEM L鎖可変領域遺伝子を含有する約3.8 kb HindⅢフラグメントを単離し、得られたフラグメントをHindⅢ消化プラスミドpHKF-1にライゲートすることによって構築した。プラスミドpSV2gpt(受託番号ATCC 37145の下でATCCから入手可能)を制限酵素EcoRⅠで消化し、ClaⅠリンカー(配列: dCATCCGATG)をEcoRⅠ部位にライゲートしてプラスミドpSV2gpt-Claを調製した。次に、プラスミドpHKCE-10を制限酵素ClaⅠおよびBamHⅠで消化し、ヒトL鎖定常領域遺伝子に結合したCEM L鎖可変領域遺伝子を含有する約9.0 kb ClaⅠ/BamHⅠ制限

(1988年3月4日寄託)。プラスミドpMHCE-30およびpHG1Zの制限部位および機能地図を添付の第3図に示す。

プラスミドpHGCEM-30を、プラスミドpMHCE-30由来のCEM H鎖可変領域遺伝子を含有する約5.3 kb ClaⅠ/HindⅢフラグメントを単離し、得られたフラグメントをClaⅠ/HindⅢ消化ベクターpHG1Zにライゲートすることによって構築した。プラスミドpMHCE-30は1つ以上のBamHⅠ部位を含有しているので、すべてClaⅠ消化した後にBamHⅠで部分消化すれば、プラスミドpMHCE-30の5.3 kb ClaⅠ/HindⅢ制限フラグメントが最も容易に単離される。プラスミドpSV2neo(ATCC 37149)を制限酵素EcoRⅠで消化し、ClaⅠリンカー(配列: dCATCCGATG)をEcoRⅠ部位にライゲートしてプラスミドpSV2neo-Claを調製した。次いで、プラスミドpSV2neo-Claを制限酵素BamHⅠおよびClaⅠで完全消化し、約4.5 kb ベクターフラグメントを単離した。

フラグメントを単離した。また、プラスミドpSV2gpt-Claも制限酵素ClaⅠおよびBamHⅠで消化し、約4.5 kbのClaⅠ/BamHⅠ制限フラグメントを単離した。プラスミドpHKCE-10由来の約9.0 kb フラグメントをプラスミドpSV2gpt-Claの上記約4.5 kb ベクターフラグメントにライゲートし、発現プラスミドpGCEMKを調製した。プラスミドpHKCE-10およびpGCEMKの制限部位および機能地図を添付の第2図に示す。

プラスミドpMHCE-30は、ヒト癌胎児性抗原を認識する、モノクローナル抗体CEMのH鎖可変領域のゲノム配列(genomic sequence)を含有している。プラスミドpMHCE-30はATCCコレクション(1988年3月4日に寄託)の一部を構成しており、受託番号ATCC 67640の下に入手可能である。プラスミドpHG1Zはヒト抗体のH鎖可変領域のゲノム配列を含有している。プラスミドpHG1Zは受託番号ATCC 67638の下、ATCCに寄託されている

プラスミドpHGCEM-30を制限酵素ClaⅠで完全消化した後、制限酵素BamHⅠで部分消化することで、ヒトH鎖定常領域をコードしている遺伝子に連結したCEM H鎖可変領域をコードしている遺伝子を含有する約12.7 kb 制限フラグメントを単離した。プラスミドpHGCEM-30の約12.7 kb ClaⅠ/BamHⅠ制限フラグメントを、プラスミドpSV2neo-Claの約4.5 kb ClaⅠ/BamHⅠベクターフラグメントにライゲートし、発現ベクターpNCEMG1を調製した。プラスミドpHGCEM-30およびpNCEMG1の制限部位および機能地図を添付の第4図に示す。

プラスミドpGCEMKを制限酵素ClaⅠおよびBamHⅠで消化し、約8.9 kb ClaⅠ/BamHⅠ制限フラグメントを単離した。また、プラスミドpNCEMG1も制限酵素ClaⅠおよびBamHⅠで消化し、約17.6 kb ClaⅠ/BamHⅠ制限フラグメントを単離した。次いで、プラスミドpGCEMKの約8.9 kb ClaⅠ/BamHⅠ制限フ

ラグメントをプラスミドpNC EMG Iの約17.6 kb ClaI / BamHI制限フラグメントにライゲートし、発現ベクターpNC EMKG Iを調製した。プラスミドpNC EMKG Iは、ヒトL鎖定常領域をコードしている遺伝子に結合した、CEM L鎖可変領域をコードしている遺伝子、およびヒトH鎖可変領域をコードしている遺伝子に結合した、CEM H鎖可変領域をコードしている遺伝子を含有している。プラスミドpNC EMKG Iはさらに、ネオマイシン耐性付与遺伝子を含有している。プラスミドpNC EMKG Iの制限部位および機能地図を添付の第5図に示す。

プラスミドpMLCH Iは、金属キレートを認識する、モノクローナル抗体CHAのL鎖可変領域をコードしているゲノム配列を含有している。プラスミドpMLCH Iは、ノーザン・リージョナル・リサーチ・ラボラトリー、ペオリア、イリノア(Northern Regional Research Laboratory(NRRL), Peoria, Illinois)のパーマネント・ストック・カルチャー・コレクションの一

Bの約5.75 kb HindIII / BamHI制限フラグメントをプラスミドpBR 322のHindIII / BamHI消化ベクターフラグメントにライゲートし、プラスミドpMLCH 2を調製した。次いで、プラスミドpMLCH 2を制限酵素ClaIおよびBamHIで消化し、約5.75 kbのClaI / HindIII制限フラグメントを単離し、ClaI / BamHI消化プラスミドpSV 2 gpt-ClaIにライゲートしてプラスミドpGCHAを調製した。

プラスミドpGCHAを制限酵素BamHIで消化し、11.2 kbフラグメントを精製した。ヒトL鎖定常領域をコードしている遺伝子を含有するプラスミドpHKF Iを制限酵素HindIIIで消化し、クレノウで充填し、リン酸化BamHI (NEB) リンカーを加え、次いで得られたベクターをBamHIで切断し、約5.2 kb BamHI制限フラグメントを単離した。次いで、得られたプラスミドpHKF Iの約5.2 kb BamHI制限フラグメントをプラスミドpGCHAのBamHI消化ベクターフラグメントにライゲートすることで、ヒトL鎖

部として寄託されている菌株、E. coli K12 HB101 / pMLCH Iから簡単に単離することができる。E. coli K12 HB101 / pMLCH I (1988年11月14日寄託)の培養物は、受託番号NRRL B-18432の下、NRRLから得ることができる。プラスミドpMLCH Iを制限酵素BamHIで消化した後、クレノウ酵素で処理し、このプラスミドの構造遺伝子の5'側にあるBamHI部位を除去した。このベクターフラグメントを再度ライゲートし、プラスミドpMLCH IdBを創造した。プラスミドpMLCH IおよびpMLCH IdBの制限部位および機能地図を添付の第6図に示す。

プラスミドpMLCH IdBを制限酵素HindIIIおよびBamHIで消化し、CHA H鎖可変領域をコードしている遺伝子を含有する約5.75 kb HindIII / BamHI制限フラグメントを単離した。プラスミドpBR 322も制限酵素HindIIIおよびBamHIで消化し、大きなベクターフラグメントを精製した。次いで、プラスミドpMLCH Id

定常領域をコードしている遺伝子に結合した、CHA L鎖可変領域をコードしている遺伝子を含有する発現プラスミドpGCHAKを調製した。プラスミドpGCHAKの制限部位および機能地図を添付の第7図に示す。

プラスミドpUCVH Inc-1Aは、金属キレートを認識する、モノクローナル抗体CHAのH鎖可変領域をコードしているゲノム配列を含有している。プラスミドpUCVH Inc-1Aは、NRRLのパーマネント・ストック・カルチャー・コレクションの一部を構成し、寄託されている(1988年11月14日)菌株であるE. coli K12 HB101 / pUCVH Inc-1Aから簡単に単離することができる。E. coli K12 HB101 / pUCVH Inc-1Aの培養物は、受託番号NRRL B-18433の下で入手できる。プラスミドpUCVH Inc-1Aを制限酵素HindIIIで消化し、CHA H鎖可変領域をコードしている遺伝子を含有する約3.4 kbのHindIII制限フラグメントを単離した。ヒトH鎖定常領域をコ

ードしている遺伝子を含有するプラスミドpHG1Z (ATCC 67638) も、制限酵素HindⅢで消化し、次いで子牛腸内アルカリホスファターゼで処理し、平滑末端を創製した。プラスミドpUCVHinc-1Aの約3.4 kb HindⅢ制限フラグメントを、HindⅢ消化してリン酸化したプラスミドpHG1Zのベクターフラグメントにライゲートし、プラスミドpHG1-CHAを調製した。プラスミドpUCVHinc-1AおよびpHG1-CHAの制限部位および機能地図を添付の第8図に示す。

ヒトH鎖定常領域をコードしている遺伝子に連結した、CHA H鎖可変領域をコードしている遺伝子を含有するプラスミドpHG1-CHAを、制限酵素ClaIおよびBamHIで消化し、約10.5 kbのClaI/BamHI制限フラグメントを単離した。次に、プラスミドpSV2neo-Claを制限酵素BamHIおよびClaIで消化し、約5.0 kbのClaI/BamHIベクターフラグメントを精製した。プラスミドpHG1-CHAの約1

HAKG1を調製した。プラスミドpGCHAKG1は、ヒトL鎖定常領域をコードしている遺伝子に結合した、CHAL鎖可変領域をコードしている遺伝子、およびヒトH鎖定常領域をコードしている遺伝子に結合したCHA可変領域をコードしている遺伝子を含有している。プラスミドpGCHAKG1はさらに、ミコフェノール酸に対する耐性を付与する遺伝子を含有している。プラスミドpGCHAKG1の制限部位および機能地図を添付の第10図に示す。

哺乳動物および他の真核性細胞を形質転換し、かつその中で各種の抗体鎖を発現させるのに適したベクターを構築するには、組換えCEMおよびCHA免疫グロブリンおよび誘導体をコードしている本発明のDNA化合物が特に好ましい。多くの哺乳動物宿主細胞は、本発明で例示される各種の抗体鎖のアミノ末端に存在するシグナルペプチドを認識し、適切にプロセッシングするために必須の細胞機構(cellular machinery)を有している。幾つかの哺乳動物宿主細胞は、さらに、抗体分子

0.5 kb ClaI/BamHI制限フラグメントをプラスミドpSV2gpt-Claの約5.0 kb ClaI/BamHIベクターフラグメントにライゲートし、発現ベクターpGCHAG1を調製した。プラスミドpGCHAG1の制限部位および機能地図を添付の第9図に示す。

プラスミドpGCHAG1を制限酵素ClaIで消化し、約15.05 kb ClaI制限フラグメントを単離した。プラスミドpGCHAKを制限酵素BamHIで消化し、ClaIリンカー：

```

5'-GATCCGGGATCGATGGGG-3'
      |||||
3'-GCCCTAGCTACCCCCTAG-5'

```

をそのBamHI部位にライゲートし、プラスミドpGCHAK-Claを調製した。次いで、プラスミドpGCHAK-Claを制限酵素ClaIで消化し、約10.85 kb ClaI制限フラグメントを単離した。次いで、プラスミドpGCHAK-Claの約10.85 kb ClaI制限フラグメントをベクターpGCHAG1の約15.05 kb ClaIフラグメントにライゲートし、発現プラスミドpGC

内に認められる翻訳後修飾(例えば、グリコシル化)を行うことができる。真核性宿主細胞を形質転換するためのベクターの変種は広範囲で存在するので、以下で例示する特定のベクターは本発明の範囲の限定を意図するものではない。

本発明の各種発現ベクターは、各種の真核性、特に哺乳動物の宿主細胞を形質転換することができ、その中で発現することができる。さらに、本発明の発現ベクターは、大腸菌(E. coli)内での複製を許容する配列を含有している。抗体の発現は、その抗体の構造遺伝子と関連性を有する特定のプロモーターが機能する宿主細胞で起こる。当業者ならば、本発明に係る各種の抗体鎖を発現するのに各種の真核性宿主細胞を使用することができることを理解するものである。SP2/O-Ag14セルラインは、普通は抗体を分泌しないミエローマセルラインである。プラスミドpGCHAKG1およびpNCCEMKG1でセルラインSP2/Oをトランスフェクトした後では、トランスフェクトされたセルラインは、2機能性キメ

ラCEM/CHA抗体を培養液中に分泌する。サブクローン実験の後、分泌性細胞を血清不含の培地に転化することによって、2機能性抗体が $15 \mu\text{g}/\text{ml}/10^6$ 細胞までのレベルで発現され得ることが証明された。SP2/O細胞は本発明の発現ベクターとしては好ましい宿主細胞であり、当業者は、本発明の2機能性抗体または誘導体を発現させるのに広範囲の各種細胞を利用できることを認識するものである。

本発明で使用される宿主細胞は、当業者周知の標準的なトランスフェクション法を用い、様々な方法で形質転換することができる。標準的なトランスフェクション法の内、電気穿孔法、プロトプラスト融合法、およびリン酸カルシウム沈澱法を用いることができる。そのような方法は、概して以下の文献に記載されている：トネグッゾーら(Toneguzzo, F.)、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー、6:703-706(1986)；チョーら(Chu, G.)、ニュクレイック・アシッズ・リサーチ、15:1311-1325(198

する発現ベクターでトランスフェクトする。しかしながら、CHAおよびCEM構築物の両者を同時に宿主細胞に導入してもよく、または逆の順序で導入してもよいことは、認められるであろう。例えば、本明細書に記載する方法によれば、異なる特異性の2つのL鎖または異なる特異性の2つのH鎖を含有するベクターを構築し、これらのベクターで宿主細胞を連続的に、あるいは同時にトランスフェクトすることが可能であろう。別法としては、CEMおよびCHA遺伝子構築物の両方を単一の発現ベクター上に結合することができ、あるいはこの2つのDNA構築物を宿主細胞の形質転換の前に線状化し、互いにライゲートすることができるであろう。トランスフェクションおよび選択ののち、標準的な分析を行い、CEAおよび金属キレートに対する抗体を検出し、本発明の2機能性キメラ抗体を発現する宿主細胞を同定する。

pSV2クラスのベクターから構築された発現ベクターからSV40エンハンサーを除去するこ

7)；ライスら(Rice, D.)、プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズUSA、79:7862-7865(1979)；およびオイラ(Oliver, V.)、プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズUSA、80:825-829(1983)。

本発明のCEMおよびCHA構築物を含有する組換え発現ベクターで、宿主細胞を連続的にトランスフェクトすることが好ましい。例えば、宿主細胞をまず、CHA構築物を含有する発現ベクターでトランスフェクトし、CHA免疫グロブリン鎖を発現する形質転換宿主細胞を当業界周知の方法で選択する[エングボールおよびパールマンら(Engvall, E. and Perlman P.)、イムノケミストリー(Immunochimistry)、8:871-874(1971)、またはメアレスおよびデイビットの米国特許第4,722,892号(1988年2月2日発行)を参照]。その後、選択した宿主細胞を、CEM免疫グロブリン遺伝子構築物を含有

とにより、より高レベルに発現させることができる。殆どすべてのゲノム性免疫グロブリン遺伝子はエンハンサー配列を含有している。本発明のプラスミド上に見いだされるネズミ可変領域遺伝子はすべて、ゲノムライブラリーから免疫グロブリン遺伝子と共にクローンされるネズミエンハンサー配列と結合して見いだされる。当業者ならば、これらの免疫グロブリン鎖を産生すべくトランスフェクトされた細胞の能力を変化させることなく、これらのエンハンサー配列を発現ベクター上、種々の部位に移動させ得ることが理解されるであろう。しかしながら、発現ベクターpNCEMKG1またはpGCHAKG1からSV40エンハンサーを除去すると(これにより、プラスミドpNCEMKG1(E-)およびpGCHAKG1(E-)が調製される)、SP2/O細胞からの2機能性キメラCEM/CHA抗体の発現レベルを増大させることができる。

プラスミドpGCEMK上に見いだされるCEMキャパプロモーターもまた、ヘテロローガス免

疫グロブリン鎖の発現レベルを増大するのに有用である。本明細書で使用する「ヘテロローガス免疫グロブリン鎖」とは、プラスミドpGCCEMK上にコードされているネズミカッパL鎖以外の免疫グロブリン鎖を意味するものとする。SV40エンハンサー含有ベクター上のCEMカッパプロモーターによって作動するネズミラムグCHA可変領域遺伝子とヒト定常領域遺伝子とを含有するプラスミドpGCHAK-2は、実施例7に記載の方法に従って構築される。SV40エンハンサーを欠如するベクター内のCEMカッパプロモーターによって作動するネズミラムグCHA可変領域遺伝子とヒト定常領域遺伝子とを含有するプラスミドpGCHAK-3もまた、実施例7に記載の方法に従って構築される。プラスミドpGCHAKG1を構築する目的の方法においてプラスミドpGCHAKをプラスミドpGCHAK-2と置き換えると、容易にプラスミドpGCHAKG1-2を構築することができる。同様の方法で、プラスミドpGCHAKG1を構築する方法におい

法によって精製することができる【カセリン(Catherine B. Beidler)、ジョンソン(M. J. Johnson)およびジェイムス(James R. Ludwig)、キメリック・アンチボディー・ディレクテッド・アゲインスト・メタル・キレイツ(Chimeric Antibodies Directed Against Metal Chelates)、同日出願の米国特許出願第07/272,577号、およびジョンソン(M. J. Johnson)、キメリック・アンチボディー・ディレクテッド・アゲインスト・メタル・キレイツ、同日出願の米国特許出願第07/274,106号参照】。

各種の方法によって、2機能性キメラCEM/CHA抗体の存在を検出することができる。1つの方法は、ポリスチレンビーズを、CEAを認識するモノクローナル抗体CEV124で被覆することである。次ぎに、CEAをポリスチレン/CEV124複合体に結合させる。別法としては、抗体リンカーを介さずに、CEAをマイクロタイター・プレート・ウェルに直接結合させることもできる。次いで、2機能性キメラCEM/CHA

で、プラスミドpGCHAG1をプラスミドpGCHAG1(E-)と置き換え、pGCHAKをpGCHAK-2と置き換えると、プラスミドpGCHAKG1-3を構築することができる。プラスミドpGCHAKG1-2またはpGCHAKG1-3のいずれか一方でトランスフェクトした後、ベクターpNCEMKG1でトランスフェクトしたSP2/O細胞は、ベクターpGCHAKG1およびpNCEMKG1でトランスフェクトした細胞よりも高い、2機能性キメラCEM/CHA抗体の発現レベルを示すものである。

トランスフェクトした宿主内で遺伝子を発現させると、成熟2機能性キメラCEM/CHA抗体はその上清中に分泌される。組換え技法により生産される多くの抗体が不必要な異質性(幾つかのガンマ鎖のC-末端に発生する異質のアミノ酸またはアミノ酸群から生じる)を現わすので、培養液は一般に、採取した後、濃縮し、カルボキシベンチダーゼの溶液で処理する。次いで、この2機能性キメラCEM/CHA抗体は当業界周知の方

抗体を含有する上清をこのビーズと共にインキュベートし、これによって、CEM/CHAのCEA認識アームを、ビーズに結合されたCEAと結合させる。次いで、放射標識化インジウム-EDTAキレートをこれらビーズに加える。2機能性キメラCEM/CHA抗体のCHAアームはインジウム-EDTAキレートと結合するので、これによりガンマカウンターを使用すれば抗体力価を測定することができる。インジウム-EDTAキレートは米国特許第4,722,892号(1988年2月2日発行)に開示されている。当業者であれば、分泌された本発明のCEM/CHA抗体を試験、検定するのに利用できる方法には、実質的に無限にあることを認識している。

本発明の抗体は、血清中または組織試料中のCEAをインビトロ検出するのに広く利用できる一方、インビボのCEA検出にも極めて有用である。抗体のキメラ部分は、架橋反応性および血清の病態の可能性を減少させるので、疾患状態の発見および治療の両者にとって複数回投与の方法を可能

とする。2機能性キメラCEM/CHA抗体を注入すると、CEAが局在する腫瘍部位に局在化させることができる。その後、放射性核種インジウム-EDTAキレートを注入すればよく、この金属キレートは小さい分子であるので、非結合性の金属キレートは体から急速に消失し、従って非腫瘍組織への損傷の可能性を減じることができる。腫瘍のイメージングを望む場合、放射性核種の選択に当たっては、好ましくは、フォトスキャニング法によって検出される得る、その放射線放出、通常はガンマフォトンに基づいて選択する。腫瘍の大きさを減少させるような腫瘍治療を望む場合は、放射性核種が電子または α -粒子を放出するのが好ましい。有用な γ -線放出同位体の中では、 ^{111}In が好ましい。 α -粒子を放出する有用な同位体の中では、 ^{212}Pb が好ましい。

他の適用法では、2機能性キメラCEM/CHA抗体を注入し、それをCEAに関連する腫瘍部位に局在化させる。次いで、金属キレートと結合(コンジュゲート)させた毒素または薬物を注入

し、抗体が腫瘍部位で結合するようにすることができる。この適用法では、金属が、原子番号が抗体と強くは結合しないキレートの金属にまで崩壊して変化する放射性核種の場合、その抗体は、腫瘍細胞付近に、そのキレートおよび随伴薬物または毒素を放出し、腫瘍細胞への侵入を容易にする。このような場合、放射性核種の選択に当たっては、放出の時期が早すぎず、または長すぎないような半減期を有する核種を選択する。

本発明をさらに説明するため、以下に実施例を記載するが、これらは、いかなる意味においても発明の範囲を限定するものではない。本明細書に記載したアミノ酸およびヌクレオチド配列は、キメラ2機能性CEM/CHA抗体の構築した成分を含有するが、これらの配列に若干の改変を加えても、CEAまたは金属キレートの結合性が実質的に同等であれば、改良法とみなすべきことは理解できるであろう。本発明は、CEAまたは金属キレートに対する必須の特異性を保持する限りは、これらの改変物も包含するものである。

実施例

下記実施例では、各種の λ 鎖およびH鎖可変領域を得るためにゲノムDNAを誘導し、クローニングするのにCEM231.6.7と命名されるネズミハイブリドーマ細胞を使用した。ネズミハイブリドーマCEM231.6.7は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ロックビレ、メリーランドに寄託番号ATCC HB 9620の下に寄託されている。ネズミハイブリドーマCEM231.6.7からクローニングしたゲノムDNAおよびヒト抹消血リンパ球をキメラ遺伝子の構築に用いた。

キメラ遺伝子のトランスフェクションは実質上、トネグツゾーら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー、6:703-706(1986)；およびチョーら、ニュクレイック・アシッズ・リサーチ、15:1311-1325(1987)に記載の方法に従い、電気穿孔法で行った。宿主細胞SP2/O-Ag14ハイブリドーマ細胞をキメラ遺伝子の受容細胞とした。使用したSP2

/O-Ag14ハイブリドーマ細胞は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ロックビレ、メリーランドに寄託番号ATCC CRL 1581の下に入手可能である。

実施例1

A. CEM231.6.7ネズミハイブリドーマからのDNAの単離

実質上、ペルサーら(Pellecer)、セル、41:133(1978)の記載に従いCEM231.6.7からゲノムDNAを単離した。遠心(10分間、800rpm IECクリニカル遠心機)して約 1×10^6 細胞を収獲した。次いで、細胞をリン酸緩衝化食塩水(PBS)で2回洗浄した。次いで、細胞を、10mM トリス-HCl(pH 8.0)、2mM EDTA、40mM NaCl(TEN)4mlに再懸濁し、10% SDS 200 μ lおよび20mg/mlのプロテアーゼK(シグマケミカルス、St. Louis, Missouri)42 μ lを加えて細胞溶解した。得られた試料を37℃で一夜インキュベートした。フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール

混液(比率25:24:1)の等容量で2回抽出し、さらにクロロホルム:アソアミルアルコール混液(比率24:1)の等容量で2回以上抽出し、10 mM トリス-HCl(pH 8.0)、1 mM EDTA (TE緩衝液)に対して一夜透析した。次いで、DNAを50 μ g/ μ lのRNAse A(シグマケミカルス、St. Louis, Missouri)により2時間処理した後、200 μ g/ μ lのプロテアーゼKにより、37℃で1時間処理した。上で詳述した如くにして再びDNAを抽出し、一夜透析した。透析の後、1/10容量の2M酢酸ナトリウムと2容量の95%エタノールとを加えてDNAをエタノール沈殿させた。-20℃で30分間放置した後、8000 rpmで30分間DNAを遠心した。得られたペレットをTE緩衝液に、最終濃度955 μ g/ μ lで再懸濁した。

B. CEM231.6.7に関するゲノムライブラリーの構築

CEM231ゲノムDNA 10 μ gをTE緩衝液11 μ l、水20 μ lおよび10 \times コア(Core)

構築した。このストラタジーンのプロトコールは、幾つかの実験手引[例、分子生物学の基本的操作(Basic Methods in Molecular Biology)、デイビス(L. C. Davis)、ディブナー(M. D. Diner)およびバティー(J. F. Battey)、Elsevier、New York(1986)]記載の方法に従っている。ショ糖勾配により単離した後、大きい分子量のCEM231.6.7 DNA(12-24 kb)を、DNA 100 ng、予め単離しておいたEMBL-3ファージアーム100 ng、10 \times リガーゼ緩衝液[500 mM トリス-HCl(pH 8.0)、70 mM MgCl₂、10 mM ジチオトレイトール(dtt)およびT4 DNAリガーゼ(2単位)]0.5 μ lを用い、4℃で一夜、EMBL-3ファージアームとライゲート(結合)させた。パッケージングは、ストラタジーンから購入可能なギガパックゴールド(Gigapack-Gold)インビトロパッケージングシステムをその製品プロトコールに従って使用し、ストラタジーン供給の宿主細胞大腸菌(E. coli)株P2.392を使用して行い、Gigapack

制限消化緩衝液(500 mM pH 8.0、100 mM MgCl₂、500 mM NaCl)15 μ lにとり、試験管に分注することにより、DNAの部分消化を行った。各管に制限酵素MboIを単位として0.0038単位から0.5単位/ μ lに増加させながら加え、37℃で1時間、放置した。次いで、試料の一部を取り、0.7%TBE(89 mM トリス、89 mM ホウ酸塩、2 mM EDTA)アガロースゲルにより、40ボルトで一夜電気泳動させた。このゲルの写真から、どの消化フラクションが正しい分子量領域(12-24 kb)のDNAを含有しているかを決定した。次いで、上記の実験で規定した単位のMboI(20倍にスケールアップ)を用い、37℃で一夜インキュベートすることによりゲノムDNA 200 μ gを消化した。このDNAを用い、ストラタジーン・インコーポレーテッド(Stratagene Inc.)(La Jolla, Ca)から購入可能なEMBL-3ファージDNAをストラタジーン(Stratagene)教示のプロトコールに従って使用してEMBL-3ファージライブラリーを

-Goldパッケージングミックス500 μ lおよびライゲートしたファージ5 μ lを22℃で2時間インキュベートした。ファージ希釈緩衝液(1 μ l中にNaCl 5.8 g、MgSO₄·6H₂O 2 g、1 M トリス-HCl、pH 7.5(50 μ l)、2%ゼラチン 5 μ l)0.5 μ lを加えた。次いで、標準的なプロトコール[モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、マニアティス(T. Maniatis)、フリッチュ(E. F. Fritsch)およびサンプローク(J. Sambrook)ら、Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor New York(1982)]でファージの力価を検定した。検定の後、ファージライブラリーをP2.392細胞を用いた密度20,000ブラック/100 mM平板にプレートし、37℃にて一夜インキュベートした。

C. ネズミCEM231.6.7 γ カッパ遺伝子を有している組換えファージ ϕ MLCE-10の同定および単離

CEM231.6.7 L鎖(カッパ鎖)に関して、

ストラタジーン Inc. (La Jolla, CA) から購入可能な E. coli P 2.392 中の 4.8×10^6 の組換えファージをモレキュラー・クロニング(前掲)のプロトコールに従ってスクリーニングした。この操作は、マーク・シュルマン博士 [(Dr. Marc Shulman)、トロント大学、トロント、カナダ] から入手したプラスミドから誘導したネズミカッパおよびネズミJ_Lプローブ、あるいはジェネラルバンクデータベース (General Bank Data Base, NIH Accession # J00545) から得た配列を有する合成プローブを用いて行った。用いたカッパオリゴヌクレオチドプローブは、式:

5'-AGA-TGG-ATA-CAG-TTG-GTG-CAG-CAT-CAG-CCC-3'

で示される配列から構成され、モレキュラー・バイオシステムズ、インコーポレーテッド (Molecular Biosystems, Inc.)、サン・ディエゴ、カリフォルニア (San Diego, CA) によって合成されたものである。

単位/ μ g) で消化した。BamHI 消化DNAを、臭化エタジウム 0.5μ g/ μ l を含んだ 0.75% TBE アガロースゲルにより、 40 V で一夜電気泳動することによって 10 kb BamHI フラグメントを単離した。UV 透過光ボックスで観察し、その 10 kb フラグメントを DEAE 81 紙上に電気泳動し [シュライヒャー (Schleicher) およびシュエル (Schuell)、キーン (Keene)、ニュー・ハンプシャー (New Hampshire)]、次いで、 1 M NaCl で溶離し、エタノール沈殿に付した。次いで、溶出したフラグメントを TE 緩衝液 6μ l に再懸濁した。得られたフラグメントを、実施例 1 B に記載のごとく、pBR322 DNA 1μ l (50 ng)、BamHI 10 kb 組換えファージ DNA リガーゼ 6μ l (300 ng) を用い、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection) (ATCC 受託番号 31344) から入手可能な BamHI 消化した pBR322 50 ng とライゲートした。ギブコー BRL (Gaithersburg, Maryland) から入手可能

重複フィルターリフトを作り、モレキュラー・クロニング(前掲)記載の方法に従い、 32 P 放射性標識したネズミカッパおよびJ_Lプローブによるプロービングを行う2重サザンブロット (double southern blots) により両プローブとハイブリライズ(雑種形勢)するファージを分析した。ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クロニング(前掲)記載の方法で行った。L 鎖可変領域遺伝子がCカッパ遺伝子領域と直接隣接した位置に再配列されたことを示す、両プローブとのハイブリライズに基づいて単一のCEM231.6.7ファージクローンを選択した。この組換えファージを ϕ MLCE-10 と命名した。

D. CEM231.6.7 ネズミ ν カッパ遺伝子 を含有している組換えプラスミドpMLCE-10の構築

ϕ MLCE-10 DNA を単離し、その 20μ g をギブコー BRL (Gibco-BRL, Gaithersburg, Maryland) 供給の反応緩衝液 (React Buffer) #3 を用い、全量 220μ l として BamHI (1 単位/ μ g) で消化した。E. coli HB101 コンピテント細胞を標準的な手法で形質転換した。まず、HB101細胞を氷の上で解凍し、次いでライゲーション反応物 10μ l を細胞 200μ l と混合し、氷上で30分間インキュベートした。次いで、細胞を、 42°C で90秒間熱ショックに付し、2分間、氷上に戻した。LBブロス (1 l 中、NaCl 10 g、酵母エキス 5 g、トリプトン 10 g) 1 ml を加え、New Brunswick 空気振盪機中で1時間、細胞をインキュベートした (225 rpm、 37°C)。次いで、 200μ l をアンピシリン (50μ g/ μ l) 含有LBアガロース上で 37°C で一夜インキュベートすることにより平板培養した。モレキュラー・クロニング(前掲)およびグルンシュタイン (Grinstein, M.) および hogness (Hogness, D.) の Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 72:3961 (1975) に詳しく記載されているコロニースクリーニング法でアンピシリン耐性コロニーをスクリーニングした。再びJ_Lおよびカッパネズミプローブを用いて組換え体 pBR322 プラスミド (p

MLCE-10と命名)を同定し、ブダベスト条約に基づき、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに1988年3月4日(ATCC受託番号#67639)に寄託した。プラスミドpMLCE-10の制限部位および機能地図を添付の第1図に示す。

E. ヒトDNAの単離

ヒトガンマハプロタイプfbnおよびazgにホモ接合性の個体から、30μlの試料中に全血試料を採取した。ソーボール(Sorvall)GLC-2B中、22℃において、2500rpmで遠心することにより血液試料からバフィー(Buffy)コート細胞を収獲した。バスツールピペットでバフィーコート細胞を取り、PBSで1回洗浄した。得られた細胞ペレットを10mM トリス-HCl(pH 8.0) 40mM NaCl 500μl中に再懸濁し、10% SDS 30μlと20μg/μlプロテアーゼK(シグマケミカルス、St. Louis, Missouri)6μlを加えて細胞溶解した。得られた試料を37℃で15時間インキュベートした。DNAを等容量

のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)混液で2回抽出し、さらにクロロホルム:イソアミルアルコール(24:1)混液で2回以上抽出したのち、10mM トリス-HCl(pH 8.0)、1mM EDTAに対して透析した。次いで、得られたDNAを50μg/μlのRNAseA(シグマケミカルス)で2時間処理した後、200μg/μlのプロテアーゼKで1時間再消化した。得られたDNAを上記の如く抽出し、透析し、OD₂₆₀で濃度測定をおこなった結果100-200μg/μlであった。

F. ヒトゲノムフェージライブラリーの構築

fbnハプロタイプのヒトDNA(実施例1Eで単離した210μg)をMboIで部分消化し、分子量12-24kbのDNAフラグメントを単離し、実施例1B記載のごとくにしてEMBL-3フェージにクローニングした。

G. 組換えプラスミドpHKF-1の単離

ヒトカッパ定常領域遺伝子を単離するために、実施例1B記載のごとく、ヒーター博士(Dr. P.

Hieter)(ジョン・ホプキンス大学、ボルチモア、メリーランド)から提供されたヒトカッパプロンプ(その配列はNIHデータベースから受託番号J00241の下で入手可能)を用いてEMBL-3ライブラリーをスクリーニングした。実施例1C記載のごとくにして、合計5×10⁶個の組換えフェージをスクリーニングした。単一のクローンを単離し、φHKF-1と命名した。φHKF-1 DNA 15μlを反応緩衝液(React Buffer)#3(Gibco-BRL、ガイザーズバーグ、メリーランド)中で、BamHIおよびHindIIIで消化した。DEAE81紙上で5.2kbフラグメントを単離し、実施例1D記載のごとく、クローニングベクターpBR322とライゲートした。ヒトカッパプロンプを用いてアンピシリン耐性組換えコロニーを再び同定し、単一のクローンを単離し、それをpHKF-1と命名した。pHKF-1は、ブダベスト条約の規定に従い、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに1988年3月4日、ATCC受託番号#67637で寄託

した。プラスミドpHKF-1の制限部位および機能地図を添付の第1図に示す。

H. CEM231.6.7V_Lカッパ遺伝子およびヒトCカッパ遺伝子を有しているプラスミドpHKCE-10の構築

全CEM231.6.7可変カッパ領域を有するpMLCE-10から得られた3.8kb HindIIIフラグメントを、実施例1D記載の方法に従い、実施例1Eに記載のプラスミドpHKF-1のHindIII部位にさらにサブクローニングし、ヒト定常カッパ領域遺伝子と融合したネズミCEM231.6.7可変領域を有するキメラプラスミドを構築した。pMLCE-10 DNA 1μgを反応緩衝液(React Buffer)#2(Gibco-BRL、ガイザーズバーグ、メリーランド)を用い、1U/μgのHindIIIで消化し、また、pHKF-1もその1μgを同様に消化した。pMLCE-10消化DNAを上記の如く電気泳動にかけ、DEAE81紙上で3.8kb HindIIIフラグメントを単離し、TE 5μlで溶出した。10×ライゲーション緩

衝液、10 mM ATP、およびT4 DNAリガーゼ2単位の存在下、全量10 μ lとして、Hind III消化 pMLCE-10の1 μ g (2 μ l) とHind III消化 pHKF-1の600 ngとをライゲートした。12℃で一夜ライゲーションを行い、実施例10に記載のごとく、再度、BR1供給のHB101コンピテント細胞をプラスミドで形質転換した。プラスミドDNAの制限マッピングによってpHKCE-10と命名されたプラスミドを同定した。プラスミドpHKCE-10の制限部位および機能地図を添付の第2図に示す。

1. キメラシシ免疫グロブリン遺伝子を含有しているプラスミドpGCEMKの構築

ヒトカッパ遺伝子に融合したネズミV_L領域を含有する真核性発現ベクターを、ベクターpSV2gpt(アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ATCC番号#37145)を用いて構築した。反応緩衝液(リアクション緩衝液)#3(Gibco-BRL、ガイザーズバーグ、メリーランド)中、pSV2gptDNA 1 μ gをDNA 1単位/ μ

単離した。実施例1B記載の試薬を用い、単離したDNAを自己ライゲーションさせた。HB101コンピテント細胞を実施例1D記載のごとくにして形質転換し、アンピシリン耐性コロニーを制限酵素消化によって分析した。

次いで、得られたベクターpSV2gpt-ClaをClaIおよびBamHI制限酵素で消化した(1単位/ μ g DNA)。さらに、これら2つの制限酵素でキメラベクターpHKCE-10を消化した。実施例1D記載のごとく、4.5 kb pSV2gpt-Cla-Bamフラグメントと9 kb Cla-Bam pHKCE-10フラグメントをDEAE 81紙で単離した。9 kb フラグメント挿入体DNA 375 ngと4.5 kb ベクターDNA 200 ngとを用い、上記のごとくにして標準的なライゲーション反応を行った。HB101の形質転換に続いて、pGCEMKと命名した組換えプラスミドをプラスミドDNAの制限マッピングによって同定した。CEMKメラシシ鎖ポリペプチドの生産に用いるキメラ発現ベクターであるこのプラスミドの制限部位

gの制限酵素EcoRIで消化した。次いで、各5 mMの4種のデオキシリボヌクレオチド類、dTTP、dGTP、dCTPおよびdATP 10 μ l、クレンワ酵素2単位および10×緩衝液(0.5 M トリス-HCl(pH 7.5)、0.1 M MgCl₂、10 mM ジチオトレイトール)中、全量50 μ lとなるように加え、モレキュラー・クローニング(前掲)記載の方法でEcoRI末端を平滑末端化した。室温で30分間反応させたのち、リン酸化ClaIリンカー(2 μ g)(ニュー・イングランド・バイオラボ、ベバリー、マサチューセッツ)をEcoRI平滑末端化pSV2gpt 500 ngとライゲートするライゲーション反応を行い、本発明のキメラベクターを得るために、新しいClaI部位を創造した。ClaIリンカー配列はd(pCATCCGATG)であった。ライゲーション反応は、実施例1B記載の方法に従って行なった。ライゲーションの後、DNAを電気泳動に付して過剰のリンカーを除去し、実施例1D記載のように線状pSV2gpt-ClaフラグメントをDEAE 81紙上に

を添付の第2図に示す。

1. CEM231.6.7 V_H遺伝子を含有している組換えファージ ϕ MHCE-30の単離

CEM231.6.7ガンマ鎖の同定のために、実施例1B記載のEMBL-3ライブラリーを2個のネズミH鎖プローブでスクリーニングした。プローブの内、1個はJ_H3-4領域を示し、フィル・タッカー博士(Dr. Phil Taucker)、(テキサス大学、ダラス、テキサス)から入手した。もう1個はネズミガンマー1遺伝子の配列を示す。後者のプローブは、ジェネラルバンクデータベース(General Bank Data Base)(NIH受託番号J00453)によって決定された式：

5'-CTG-TAC-ATA-TGC-AAG-GCT-TAC-AAC-CEC-AAT-3'で示される配列を有し、モレキュラー・バイオシステム社(サンジェゴ、CA)によって合成されたものである。合計4.8×10⁶個の組換えファージブラークを、これらの2種のプローブを用いて2回スクリーニングし、J_H領域とガンマ領域の両方を含有するクローンを同定した。これもま

たカッパクローンを有するので、これらの2領域の配列を含有するファージは、DNAが再配列されていることを示し、かくして細胞系統(セルライン)CEM231.6.7内で発現される免疫グロブリン遺伝子が同定された。この再配列に基づいて1個のCEM231.6.7クローンを選択し、 ϕ MHCE-30と命名した。

K. CEM231.6.7 V_H遺伝子を含有しているpMHCE-30の構築

H鎖可変領域配列と、ネズミH鎖エンハンサーを包含する大きいイントロンとを含有する ϕ MHCE-30由来の5.0 kb Sst I フラグメントを制限マッピングによって同定した。このフラグメントをプラスミドでサブクローンするために、ファージDNA 10 μ gを、反応緩衝液#2(Gibco-BRL、ガイザーズバーグ、メリーランド)中、制限酵素Sst Iで消化し、実施例1D記載のDEAE81法で電気泳動することにより、5.6 kb フラグメントを単離した。ストラタジーン(ラジョーラ、CA)から購入可能なブルースクリプ

0 mM トリス-HCl、pH 8.0、10 mM MgCl₂、100 mM NaCl) 中、全量200 μ lとして消化した。エタノール沈殿により、消化フラグメントを20 μ lに濃縮し、0.6%低ゲル化温度アガロース(FMC)ゲルを用い、50 μ A/cm²(ミリアンベア)で15分間泳動させた。6-7 kbの大きさのDNA断片をゲルから切り取った。クローニングベクターpUC18 [ヤニッシュ・ペロンら(Yanisch-Perron, C.), Gene 33:103 (1985)に記載されている] も上記の如く BamHI および HindIII で消化した。30 mM トリス-HCl (pH 7.6)、10 mM MgCl₂、5 mM ジチオトレイトール、1 mM ATP、および1 μ l T4 DNAリガーゼ(2単位)を含有する全量400 μ lの反応溶液中で15℃で72時間、得られたpUC18ベクター(50 ng)(ニュー・イングランド・バイオラボ、ベバリー、マサチューセッツ)にヒトDNAフラグメント(150 ng)をライゲートした。ライゲートしたDNA試料の半量(100 ng)を用い、新しく調製したコンピテントな

ト(Bluescript)ベクターM13-SK+をSst I消化した。実施例1Bに詳述したように、ベクターと単離した5.6 kb挿入体DNAとを、1:10の比率で、全量10 μ lとしてライゲートさせた。HB101コンピテント細胞の形質転換の後、制限消化マッピングし、適切な組換体を同定し、それをpMHCE-30と命名した。pMHCE-30は、ブダベスト条約の規定に従い、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに1988年3月4日、ATCC受託番号#67640で寄託した。プラスミドpMHCE-30の制限部位および機能地図を添付の第3図に示す。

L. ヒトDNAの単離

上記実施例1E記載のごとくにしてヒトDNAを単離した。

M. ヒトプラスミドライブラリーの構築

azgハプロタイプのヒトDNAの各10 μ gを制限エンドスクレアーゼBamHIおよびHindIIIを各々30単位使用し、反応緩衝液#3(Gibco-BRL、ガイザーズバーグ、メリーランド)(5

E. coli M15細胞500 μ lを形質転換し、得られた形質転換体をX-gal、IPTG、AMPプレート(4 μ g/ μ l X-gal、2 μ g/ μ l IPTG、100 μ g/ μ l アンピシリン)で平板培養した。

N. 組換えプラスミドpHG12の単離

ホンジョウ(T. Honjo)(大阪大学、日本)から提供された、タカハシら(Takahashi, N.), セル(Cell), 29:671-679(1982)に記載されているヒトガンマ2プローブを用い、実施例1に記載のごとくにして組換ヒトDNAを含有するアンピシリン耐性のpUC18コロニーをスクリーニングした。ヒトガンマ1遺伝子に相当する7.5 kb 挿入体を含有するクローンを同定し、それをHyHG1と命名した。次いで、実施例1G記載の方法を用い、ヒトガンマ定常領域遺伝子を含有するこの同じ7.5 kb HindIII-BamHIフラグメントをpBR322に再度クローニングした。ヒトガンマ1遺伝子を含有するpBR322ベクターをpHG12と命名し、ブダベスト条約

の規定に従い、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに1988年3月4日、ATCC受託番号#67638で寄託した。プラスミドpHG12の制限部位および機能地図を添付の第3図に示す。

O. CEM231.6.7 V_H遺伝子およびヒトガンマー1遺伝子を含むpHGCEM-30の構築

次のようにしてネズミ可変H鎖領域をヒトガンマー1遺伝子と融合させた。pMHCE-30(10μg)をClaI(1単位/μg)で消化し、次いで、HindIIIで部分消化し、V_Hおよび大きいイントロンを含んだ5.3kbフラグメントを得た。DNAの部分消化はわずか0.1単位/μgを用い、37℃で1時間の消化時間を要して行った。また、ヒトガンマー1遺伝子を含む実施例1N記載のプラスミドpHGZ-1(1μg)をClaIおよびHindIIIで消化した。実施例1D記載のDEAE81プロトコルを使用し、TBEゲルからpMHCE-30の5.3kbフラグメントを単離し

pSV2neo-Cla DNA 1μgを酵素ClaIおよびBamHIを1単位/μg DNAの割合で用いて消化した。プラスミドpHGCEM-30をClaIで消化した後、BamHI(0.1単位/μg)で部分消化し、キメラV_Hおよびガンマー1領域を含む12.7kbフラグメントを得た。このフラグメントをDEAE81紙上で単離し、TE緩衝液10μlで溶出した。このライゲーションは、ベクターDNA 50ng、ならびに12.7kb挿入体DNA、10×ライゲーション緩衝液、10nM ATPおよびT4 DNAリガーゼの400ngを用い、実施例1B記載のごとくにして12℃で一夜行った。HB101細胞を形質転換し、キメラ発現ベクターpNCEMG1を構成する適正な組換えプラスミドを同定した。キメラH鎖免疫グロブリン遺伝子の発現に使用される組換え発現ベクターを構成するプラスミドpNCEMG1の制限部位および機能地図を添付の第4図に示す。

Q. プラスミドpNCEMG1の構築

既述の方法に従い、プラスミドpGCEMKを

た。このフラグメントを、挿入体500ngとベクターDNA 200ngを用い、全量10μlのライゲーション混合物中、pHGZ-1のCla-Hind部位にライゲートした。ライゲーション反応は、実施例1Bの記載に従って行った。HB101の形質転換の結果、生成された組換えプラスミドを制限消化マッピングによって分析し、ヒトガンマー1遺伝子と融合したネズミV_H領域を含むプラスミドを同定し、それをpHGCEM-30と命名した。プラスミドpHGCEM-30の制限部位および機能地図を添付の第4図に示す。

P. キメラH鎖免疫グロブリン遺伝子を含むpNCEMG1の構築

実質上、実施例1H記載の方法に従い、真核性発現ベクターにキメラIg遺伝子を挿入した。用いたベクターは、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手可能なpSV2neo(ATCC番号#37149)であった。プラスミドpSV2splに関して記載したと全く同様にして、このベクターにClaI部位を付加した。次いで、

制限酵素ClaIおよびBamHIで消化し、約8.9kb ClaI/BamHI制限フラグメントを単離した。類似の方法により、プラスミドpNCEMG1も制限酵素ClaIおよびBamHIで消化し、得られた約17.6kbのClaI/BamHI制限フラグメントを精製した。次いで、プラスミドpGCEMKの約8.9kb ClaI/BamHI制限フラグメントを、実質上、実施例1Bに記載の方法に従って、プラスミドpNCEMG1の約17.6kb ClaI/BamHI制限フラグメントにライゲートした。E.coliに形質転換した後、制限マッピングによってプラスミドを再度単離し、適正な制限マップを示すプラスミドをプラスミドpNCEMG1と命名した。プラスミドpNCEMG1の制限部位および機能地図を添付の第5図に示す。

実施例2

クローニングした遺伝子のDNA配列決定

クローニングしたCEM可変L鎖およびH鎖遺伝子の配列決定は、配列決定キットSequenase(U

S: バイオケミカルズ、クリーブランド、オハイオから購入可能)、および Bluescript/DNA 配列決定システム(ストラタジーン社、ラ・ジョーラ、CA から購入可能)に示されたプロトコルを用い、1本鎖および2本鎖の両鎖型のための標準的手法により行なった。クローニングした CEM 可変鎖および H 鎖領域遺伝子に関して得られた DNA 配列から、コンピューター・ソフトウェア・プログラム、MAPSEQ (DNASTar、マディソン、ウィスコンシンから購入可能)により、コードされているポリペプチドのアミノ酸配列を推定した。

実施例 3

A. プラスミド pGCHAG1 の構築

プラスミド pUCVHI_{nc}-1A は、重金属結合性モノクローナル抗体 CHA255.5 のネズミ可変領域をコードする遺伝子を含む。プラスミド pUCVHI_{nc}-1A は、NRRL のパーマネント・ストック・カルチャー・コレクションの一部を構成する菌株として、受託番号 NRRL

0 kb ClaI/BamHI 制限フラグメントを単離した。同様の方法により、プラスミド pHG1-CHA も制限酵素 ClaI および BamHI で消化し、約 10.5 kb の制限フラグメントを単離した。プラスミド pSV2gpt-Cla の約 5.0 kb ClaI/BamHI 制限フラグメントをプラスミド pHG1-CHA の約 10.5 kb ClaI/BamHI 制限フラグメントとライゲートさせ、プラスミド pGCHAG1 を構築した。プラスミド pGCHAG1 の制限部位および機能地図を添付の第 9 図に示す。

B. プラスミド pGCHAK の構築

プラスミド pMLCH-1 (E. coli K12 HB101/pMLCH-1 NRRL B-18432 から入手) 約 1 μg を制限酵素 BamHI で 3 分間消化した。エタノール沈澱した後、4 種類の 5 mM デオキシリボヌクレオチド (dTTP、dGTP、dATP および dCTP) 各々 10 μl、クレンク酵素 2 単位、および 10×緩衝液 (0.5 M トリス-HCl (pH 7.5)、0.1 M MgCl₂、

L B-18433 の下で入手可能な E. coli K12 HB101/pUCVHI_{nc}-1A から通常の方法で単離できる。プラスミド pHG1Z はヒトガンマ遺伝子を含むしており、ATCC から、受託番号 ATCC 67638 の下で入手可能である。プラスミド pUCVHI_{nc}-1A 約 1 μg を制限酵素 HindIII で消化し、約 3.4 kb の HindIII 制限フラグメントを単離した。さらに、プラスミド pHG1Z 約 1 μg も制限酵素 HindIII で消化し、当業界周知の方法で細菌性アルカリホスファターゼで処理した。次いで、プラスミド pUCVHI_{nc}-1A の約 3.4 kb HindIII フラグメントを、HindIII 消化してホスファターゼ処理したプラスミド pHG1Z のフラグメントとライゲートし、プラスミド pHG1-CHA を構築した。プラスミド pUCVHI_{nc}-1A および pHG1-CHA の制限部位および機能地図を添付の第 8 図に示す。

プラスミド pSV2gpt-Cla (実施例 1 で構築) を制限酵素 ClaI および BamHI で消化し、約 5.

および 10 mM DTT) 5 μl を加え、全反応容量 50 μl 中で BamHI 末端を平滑末端化した。37℃ で 30 分間経過後、フェノール、クロロホルム抽出によって反応を止め、得られた DNA を自己ライゲートさせ、E. coli 細胞を形質転換した。BamHI 部位の欠失を示すプラスミドをプラスミド pMLCH1dB と命名した。プラスミド pMLCH1 および pMLCH1dB の制限部位および機能地図を添付の第 6 図に示す。

次いで、プラスミド pMLCH1dB を制限酵素 BamHI および HindIII で消化し、約 5.75 kb の CHA ラムダ遺伝子領域を単離することによって、プラスミド pMLCH2 を構築した。次いで、このフラグメントを BamHI/HindIII 消化プラスミド pBR322 にライゲートさせてプラスミド pMLCH2 を構築した。次いで、プラスミド pMLCH2 を制限酵素 ClaI および BamHI で消化し、約 5.75 kb 制限フラグメントを単離した後、プラスミド pSV2gpt-Cla (実施例 1 で構築) の ClaI/BamHI 消化ベクターフラグメン

トにライゲートし、プラスミド pGCH A を構築した。

プラスミドpGCHAを制限酵素BamHIで消化し、約11.2 kbの制限フラグメントを単離した。プラスミドpHKF1 (ATCCから受託番号67637の下で入手可能)を制限酵素HindIIIで消化し、クレノクで充填し、リン酸化BamHIリンカー (NEB)を加えた後、ベクターをBamHIで切断し、約5.2 kbの制限フラグメントを単離した。次いで、プラスミドpGCHAの約11.2 kb BamHIフラグメントをプラスミドpHKF1の約5.2 kb BamHI制限フラグメントとライゲートさせ、ヒトガンマ領域をコードしている遺伝子と結合した、ネズミラムダGCHA可変領域をコードしている遺伝子を含むプラスミドpGCHAKを構築した。プラスミドpGCHAKの制限部位および機能地図を添付の第7図に示す。

C. プラスミドpGCHAKG1の構築

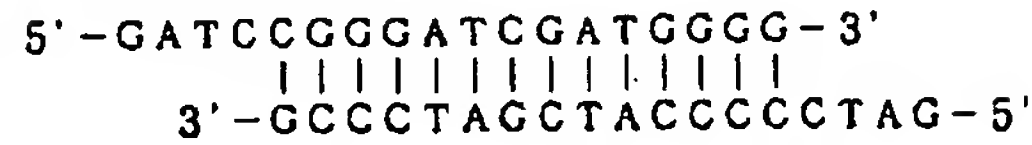
プラスミド pGCHAK の約 1 μ g を制限酵素

· 实施例 4

A. キメラ構築物pGCHAKG1によるSP.
2/0細胞のトランスフェクション

上記実施例3に記載のように、トランスフェクションに用いたCHA免疫グロブリンプラスミドは、pGCHAKG1であった。pGCHAKG1プラスミドを、まず既述の電気穿孔法により、SP2/0ハイブリドーマ細胞にトランスフェクトする。SP2/0-Ag14細胞を5%FCS含有培地で培養し、電気穿孔法適用前3日間、増殖の対数期に保持した。プラスミドベクターpGCHAKG1(20μg)を制限酵素PvuI(1u/μg)および反応緩衝液#7(Gibco-BRL、ガイザーズバーグ、メリーランド)を用いて線状化した。トランスフェクションに際しては、1ECクリニカル遠心機(800rpm、10分間、室温)により、SP2/0細胞を採取した。次いで、細胞を、6mMデキストロースを含んだHankの緩衝化食塩水(Gibco Laboratories、グランドアイランド、ニューヨーク)を用いて3回洗浄し、終

B₂H₆で消化し、実施例 11 に記載の方法に実質的に従い、式：



で示される ClaI リンカーを得られた BamHI 部位にライゲートした。ライゲート反応の後、形質転換および再単離して得られたプラスミドを pGCHAK-ClaI と命名した。従来技術に従い、プラスミド pGCHAK-ClaI を制限酵素 ClaI で消化し、約 10.85 kb ClaI 制限フラグメントを単離した。プラスミド pGCHAGI を制限酵素 ClaI で消化し、約 15.05 kb の制限フラグメントを単離した。次いで、プラスミド pGCHAK-ClaI の約 10.85 kb ClaI 制限フラグメントをプラスミド pGCHAG の約 15.05 kb ClaI フラグメントにライゲートした。形質転換および再単離の後、適正な制限マップを有するプラスミドをプラスミド pGCHAKGI と命名した。プラスミド pGCHAKGI の制限部位および機能地図を添付の第 10 図に示す。

濃度 1.5×10^7 細胞/ μ l に再懸濁した。キュベットに細胞 0.3μ l を密度 $0.5 \times 10^8 / 0.3 \mu$ l で分注し、線状化した DNA を加えた。得られた混合物を氷上に 10 分間置いた。0.8 mmギャップの電極 (P/N 472) および BTX 100 トランスフェクター (BTX Inc. サンジエゴ、CA) を用いて電気穿孔を行った。条件は、250 ボルトで、5 ms seconds ごとに 1 パルスである。次いで、電気穿孔した細胞を密度 $2 \times 10^6 / \mu$ l (T75 フラスコ中) で培地に 72 時間、再懸濁させた (37℃、5% CO₂)。次いで、細胞を、24 ウェルプレート中の適当な抗生物質に密度 $5 \times 10^6 / \mu$ l でプレートし、pGCHAKG1 を含有する SP2/0 細胞を HMAX 1.0 培地 (50 ng/ μ l ヒポキサンチン、250 ng/ μ l ミコフェノール酸および 50 μ g/ μ l キサンチン、シグマ、セントルイス、ミゾリーから入手可能) に 1 μ g/ μ l でプレートした。HMAX 耐性コロニーを含有する各ウェルから上清 200 μ l を収集した。次いで、この上清を、pGCHAKG

1のキメラ免疫グロブリン遺伝子の発現を示す、ヒトカッパ定常領域およびヒトガンマ定常領域の存在に関して分析した。

B. キメラCHA255を分泌するSP2/O細胞の同定

キメラCHA-ヒトIg遺伝子を発現するトランスフェクトされたSP2/O細胞を、エングバルおよびパールマン [Engvall, E. and Perlman, P., Immunochimistry, 8: 871-874 (1971)] に記載のごとく、ヒトIgを対象とする標準的な酵素結合免疫吸着検定 (エリザ、ELISA) により、同定した。

この検定の目的は、ネズミハイブリドーマCHA255から単離し、ヒト定常領域遺伝子と融合させたネズミ可変領域から構築されたpGCHAKG1プラスミドベクターによってコードされているキメラカッパおよびガンマ鎖ポリペプチドを分泌する細胞を同定することにある。10mMリン酸ナトリウム (pH 7-8) 中、ヤギ抗-ヒトガンマ鎖 (Tago #4100) の5μg/μl 溶液

機能性キメラ構築物pNCCEMKG1の誘導のために増幅させた。

高レベルでCHA Ig鎖を発現した細胞をさらに、金属キレートと特異的に反応する免疫グロブリンの産生に関して検定した。金属キレートに対する抗体を検出するのに使用した検定操作法は、ウォン (Yang, R.) らの Immunol. Methods, 18: 157-164 (1977)、リードン (Reardon) らのネイチャー 316: 265-268 (1985)、ならびにメアレスおよびデイビッドの米国特許第4,722,892号 (1988年2月2日発行) に記載の方法に実質的に従った標準的な固相ラジオイムノアッセイである。

以下に記載の試薬をマイクロタイタープレートの各ウェルに加え、混合しながら室温で一晩インキュベートした: 試薬 — 細胞培養上清25μl、111In-EDTA 50μl、セファロース結合ヤギ抗-ヒトIgG 20μl、および細胞培養培地25μl。セファロース-抗-ヒトIgGに結合した免疫コンプレックス (免疫複合体) をペーバ

を調製した。96ウェルプレートの各ウェルをこの溶液50μlで覆った。次いで、そのプレートを37℃で一晩インキュベートした。次いで、プレートを水およびPBS+0.1% Tween (w/v) 中でよく洗浄した。上清フラクション50μlを各ウェルに入れ、室温で2時間インキュベートした。上で記載したように、プレートを再度洗浄した。上清物質の培地と同じ培地でヤギ抗-ヒトカッパ鎖アルカリホスファターゼ結合体 (コンジュゲート体、Tago #2496) を1/1000に希釈した。ウェルあたり100μlを加え、室温で1時間インキュベートした。上記のごとくプレートを洗浄した。包装容器の指示に従い、アルカリホスファターゼの基質を調製し、蒸留水3mlとこの基質150μl毎に錠剤1個を各ウェルに加え、37℃で30分間インキュベートした。500mM EDTA (50μl) を加えて反応を停止 (クエンチ) させ、次いで405nmの吸光度を測定した。最高レベルのIg発現を示す上清を同定し、対応するウェルから細胞を分取し、2

ーフィルターに捕集した。フィルターをガンマカウンターで計数した。このラジオイムノアッセイの結果、キメラCHA抗体を分泌するクローンが同定された。プラスミドpNCCEMKG1でトランスフェクトするためにこれらのクローンを選択した。

C. CEMキメラ構築物pNCCEMKG1によるキメラCHA産生細胞のトランスフェクション

実施例1に詳述した構築物から誘導したCEM免疫グロブリンプラスミド、pNCCEMKG1を用いてSP2/O細胞をトランスフェクトした。次いで、採取したキメラCHA遺伝子を発現する細胞集団 (セル・ポピュレーション) をキメラCEM遺伝子を含むプラスミド構築物を用いて電気穿孔に付した。CHA遺伝子の電気穿孔については、SP2/OキメラCHA産生細胞 (SP2/O-K) を電気穿孔処理の前、3日間対数増殖期に維持しておいた。プラスミドDNA、pNCCEMKG1 (20μg) を反応緩衝液 #6 (Gibco-BRL, Gaithersburg, Maryland) 中、酵

素PvuIで線状化した。細胞を集め、洗浄し、実施例2Aに詳述したように、密度 1.5×10^5 細胞/ μl に再懸濁した。上記DNAを加え、電気穿孔の前に、得られた混合物を氷上に10分間放置した。使用した条件は、1パルス/5 msec.、250ボルトである。細胞を、密度 2.5×10^5 細胞/ μl で、HMAX 1.0を添加した5% FCSを含有するHH2（または他の市販されている培地）中、37℃で5% CO_2 存在下、72時間培養した。次いで、これらの細胞を、HMAX 1.0および有効濃度 $500 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ のG418抗生物質（ジェネテシス、Gibco-BRL, Gaithersburg, Maryland）を含有する培地中、24ウェルのプレートに $5 \times 10^4/\mu\text{l}$ でプレートした。14日間、選択を維持した時点で、以後の分析のためにHMAX/G418耐性コロニーを有するウェルを同定した。

実施例5

CEM/CHA 2機能性キメラ抗体を分泌するSP2/0細胞の同定および分析

B. 抗体アフィニティー

CEAに対する2機能性キメラ抗体CEM/CHAの K_a を求めるためにアフィニティー検定（親和性検定）を行った。2機能性キメラ抗体CEM/CHAのCEAに対する親和性を実施例4Aに記載の標準的なラジオイムノアッセイ操作およびスカッチャード分析（Scatchard, G., Ann. New York Acad. Sci., 51:660(1949)）によって測定した。

抗原結合検定は、実施例5Aに記載のごとくにして行った。阻害曲線の作成のために、各反応物に細胞培養培地 $25 \mu\text{l}$ の代わりにCEA $25 \mu\text{l}$ を加えた。競合物質の添加量は1-100 ngである。スカッチャード分析に関しては、結合/遊離抗原を結合抗原に対してプロットすることにより、線の負の傾きから規定されるアフィニティー定数を算出できた。キメラ抗体の親和性は少なくとも本発明のキメラ抗体を誘導するのに用いたネズミ抗体対応物のそれに匹敵していた。

同様にして、2機能性キメラ抗体CEM/CH

A. 抗原結合

キメラCEM L鎖およびH鎖の両方の免疫グロブリン遺伝子を発現し、CEAと結合する抗体を産生するトランスフェクトされたSP2/0細胞を同定するためにスクリーニング検定を行った。CEAに対する抗体の検出に用いた検定法は、ウオンら(Wang, R.) [Immunol. Methods, 18:157-164(1977)] が詳細に説明した標準的な固相ラジオイムノアッセイである。

マイクロタイタープレートのウェルに以下の試薬を加え、攪拌しながら、室温で一夜インキュベートした：細胞培養上清 $25 \mu\text{l}$ 、 ^{125}I -CEA（アフィニティー精製） $50 \mu\text{l}$ 、セファロース結合ヤギ抗-ヒトIgG $20 \mu\text{l}$ および細胞培養培地 $25 \mu\text{l}$ 。セファロース-抗-ヒトIgGと結合した免疫複合体をペーパーフィルター上に採取した。フィルターをガンマカウンターで計数した。ラジオイムノアッセイの結果、CEAと特異的に反応する抗体を発現しているクローンが同定された。

AのIn-EDTAキレートに対する K_a をも測定した。

EOTUBEのインジウム(III)錯体に対する本発明キメラ抗体の K_a を測定するため、抗体検定を行った。EOTUBEは、p-(アミノベンジル)EDTAの誘導体であり、米国特許第151855号【アンダーソン(Anderson)、フリック(J. M. Frincke)およびメイヤー(D. L. Meyer)、1988年2月3日発行】に記載されている。

EOTUBEの合成法およびその標準的なスカッチャード分析における用途を以下に記載する。

1. EOTUBEの合成

詳細には、EOTUBEは、N-(2-ヒドロキシエチル)-N'-(p-ベンジル)チオ尿素部分のベンジル炭素によってEDTAの内部エチレン炭素の1つが置換されているEDTAである（置換されている炭素の立体化学はSである）。EOTUBEの合成は、可能な限り金属イオンを排除して行った（例えば、すべてのガラス器具は6M HClで洗浄し、脱イオン水だけを用いた）。

米国特許第4,622,420号およびメアレス [Meares, C. F., Anal. Biochem., 142 68-75 (1984)] に記載のようにして、(S)-p-ニトロベンジル EDTA を調製し、(S)-4-イソチオシアネートベンジル EDTA (以下、ITCBE と略称する) に変換した。この凍結乾燥した ITCBE を 0.3 M の HCl [Ultrex, J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.] に再懸濁して終濃度がおよそ 50 mM になるようにした。この溶液を -70℃ で保存した。他に特記事項がなければ、すべての反応は 40℃ の水溶液中で行った。

20 mM の ITCBE (2.5 μl) を 200 mM エタノールアミン (1.35 μl) に加え、10 N の NaOH でその pH を 11.0 に調節した。その容量を水を用いて 5 μl に調節し、混合物を 15 分間反応させ、この時点で HPLC 分析によりチェックした。ITCBE のすべてを、HPLC [ヒューレット・パッカート (Hewlett-Packard) 1090 機; G18 カラム; 50 mM トリエチルアンモニウム・アセテートの水性緩衝液から純メタノールへの直線グ

TUBE では 3 つである。脂肪族領域では、ITCBE と EOTUBE に共通して 5 つのピークがあり、EOTUBE スペクトルにはさらに 64 および 49 ppm に 2 つのピークが存在する。この後者ピークはそれぞれ、ヒドロキシおよびチオ尿素部分に隣接する炭素に対応している。

アフィニティー操作法

1. キレート放射線標識

A. 9.9540×10^{-7} mol の EOTUBE を 600 μCi の ^{111}In で標識する。

1. 他のいかなる金属も導入することなく次の成分を金属不含の試験管に加える:

- 0.0158 M の金属不含の EOTUBE 63 μl;
- 0.26 M の金属不含のクエン酸アンモニウム (pH = 6.0) 63 μl;
- 600 μCi の ^{111}In (1.30×10^{-6} mol)。

2. 室温で一晩インキュベートする。

3. 放射活性のない(コールド)インジウムを十

ラジェント(傾斜溶媒)で溶出]で保持時間 3.6 分の EOTUBE に変換させた。

得られた生成物を、0.1 ~ 1 M のギ酸アンモニウム (pH = 6) のグラジェント (110 μl) で溶離する DEAD セファデックス (Sephadex) A-25 カラム (11 μl) の陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した (このカラムは 280 nm でモニターした)。生成物を含むフラクションを集め、凍結乾燥した。この生成物は、246 nm で極大吸収を示し、吸光係数 18,000 であった。

その構造は、 ^{13}C -NMR スペクトル法で調べた [バリアン・インスツルメンツ (Varian Instruments) XL-300 型 300 MHz 機を使用]。このスペクトル法は重水中で行った。ITCBE のイソチオシアネート部分における炭素に対応するピークは 139 ppm のところにあり、これは EOTUBE では 182 ppm のピークに変わった。このピークはチオ尿素結合における炭素に対応している。ITCBE のスペクトルの芳香族領域 (128 ~ 138 ppm) は 4 つのピークを示すが、EOTUBE

分に加え、EOTUBE に対して 1.05 モル比のインジウム (^{111}In と基底状態の ^{113}In の両方) として工程 A を行う。

- 上記 (I. A. 2) の試験管に 0.012 M の基底状態 InCl_3 10.2 μl (1.044×10^{-6} mol) を加える。

2. 室温で 4 時間インキュベートする。

C. 薄層クロマトグラフィー分析を行ってインジウムの導入を調べる。

- 長さ 10.5 インチのシリカゲルプレート (0.25 インチ帯 (ストリップ) に区画してレーンとする) の 2 つのレーンの底から 1 cm に標識した試料 0.5 μl をスポットする。
- 試料スポットを乾燥させる。
- 10% 酢酸アンモニウム: メタノール (1:1) 溶媒系を入れた TLC 槽にプレートを入れる。
- 9 cm の印のところまでプレートを展開させる。

5. プレートを取り出し、乾燥させる。
6. プレートの各レーンを3つの部分に切り分ける。
 - a. 初めの部分は底から2cmの印のところまで。
 - b. 真中の部分は2～3.5cmの部分。
 - c. 後ろの部分は3.5cmから頂上の部分。
7. 両レーンについて各部分のcpmを計数する。
8. 各レーンの後ろの部分の%は、キレートに導入されたインジウム%に等しい。

D. インジウムが90%以上導入されたときに、検定に使用するためEOTUBEをPBS (pH = 7.5)で4.40pg/μlまで希釈する。

II. コールド複合体の調製

A. 5.530×10^{-14} molのEOTUBEを、EOTUBEに対してモル比1.02 x 10⁻²でコールド・インジウムを導入する。

1. いかなる汚染金属も導入することなく次の成分を金属不含の試験管に加える：

4. 20μlが0.5μgの抗体と結合するような濃度にまで希釈したセファロースビーズに結合させたヒツジ抗-マウスIgG [マーチ等(March, S.C., Parkin, I. and Cuatrecasas, P. *Analyt. Biochem.* 80, 149(1974))] 20μl。

B. 室温の回転機で一夜インキュベートする。

C. ウェルの内容物をガラスファイバー濾紙に吸引する。

D. 濾紙ディスクを切り取り、計数する。

E. 結合した分画と抗体希釈液#の関係をグラフにする。

F. どの点(希釈液#)が最大結合の90%と等しいかを決定する。

G. 上記により決定された希釈液をスカッチャード検定に用いる。

IV. スカッチャード検定

A. 96ウェルのマイクロタイタープレートに次の成分を加える(3組)：

1. 4.4pg/μlのEOTUBE-¹²⁵I n-

- a. 7.9nMの金属不含のEOTUBE
70μl(5.530×10^{-14} mol)；
- b. 0.26Mの金属不含のクエン酸アンモニウム(pH = 6.0) 70μl；
- c. 1.0.2nMの基底状態InCl₃ 55.3μl(5.641×10^{-14} mol)。

2. 室温で4時間インキュベートする。

B. 後記IVで使用するためPBS (pH 7.5)で希釈し、0.40ng/μlを1μlおよび0.36ng/μlを1μl調製する。

III. 抗体感度曲線

A. 96ウェルのマイクロタイタープレートに次の成分を加える(3組)：

1. 4.4pg/μlのEOTUBE-¹²⁵I n-基底状態In 25μl；
2. 20、10、5、2.5、1.25、0.623、0.313、0.156、0.080、0.020、または0μg/μlの抗体希釈液25μl；
3. 10%ウマ血清を含むRPMI 50μl；

基底状態In 25μl；

2. 上記II-Bで調製した0.40ng/μlおよび0.36ng/μlの段階希釈のEOTUBE-基底状態In 25μl。11種類の希釈にそれぞれ0を加え、10ng/ウェルから下って4.40pg/ウェルの範囲に0を加えて24個の点を得る。10%ウマ血清を含むRPMIで希釈する。
3. 10%ウマ血清を含むRPMI 25μl；
4. 目的の抗体25μl (感度検定で測定した濃度)；
5. セファロースビーズと結合させたヒツジ抗-マウスIgG (感度曲線検定で用いたものと同じ) 20μl。

B. 室温の回転機で一夜インキュベートする。

C. ウェルの内容物をガラスファイバー濾紙に吸引する。

D. 濾紙ディスクを切り取り、計数する。

E. 結合/遊離のモル数に対して結合モル数を

プロットする。

F. 曲線の直線部分の直線回帰をとる：負の傾きが K_a である。

C. 2機能性キメラ抗体CEM/CHAの2機能性活性の検定

ポリスチレンビーズを、CEAと特異的に結合するモノクローナル抗体CEV.124で被覆した。次いで、CEAを被覆ビーズに加え、37℃で1時間インキュベートした後、得られたビーズをPBSで洗浄した。次いで、2機能性キメラCEM/CHAを含有する上清をこのビーズに加え、37℃で1時間反応を進行させた。PBSで洗浄した後、ビーズを10mM EDTAと37℃で1時間混合した。もう1回洗浄した後、抗体CEM/CHAを含有する免疫複合体をペーパーフィルター上に採取し、それをガンマカウンターで計数した。2機能性キメラCEM/CHAであって1つのアームがCEAと結合し、他方のアームが金属キレートに結合する抗体を産生するトランスフェクトしたSP2/O細胞を同定し、サブクローニ

0mM $MgCl_2$ 、50mM DTT) 3 μ l、dNTP混合物(各0.5mMのdATP、dTTP、dCTPおよびdGTP、pH 7.0) 3 μ l、水3 μ l、およびT4 DNAポリメラーゼ(BRL) 1 μ l (5 U)と混合した。この混合物を37℃で15分間インキュベートした後、70℃で10分間加熱した。フェノール抽出およびエタノール沈殿の後、DNAをTE緩衝液5 μ lに再懸濁した。このDNAフラグメント(約1 μ l; 約500 ng)を水10 μ l、5×ライゲーション緩衝液5 μ l、100 μ M ATP 2 μ l、およびT4リガーゼ2 μ lと混合した。室温で2時間インキュベートした後、実質上、実施例1Pの方法に従って、ライゲーション混合物でE. coli HB101細胞を形質転換した。この形質転換体からプラスミドDNAを単離し、SV40エンハンサー領域~0.3 kbの適正な欠失を示すプラスミドをプラスミドpSV2gpt(E-)と命名した。

B. プラスミドpSV2neo(E-)の構築

SV40エンハンサー不含のpSV2neoをも構

造した。血清不含の培地(HH2)に適合するよう細胞を順応させた後、全レベルが60 μ g/ μ l/10⁶細胞程に高いレベルのIgの発現性が得られた。

実施例6

SV40エンハンサー不含のクローニングシステム

システムの構築

A. プラスミドpSV2gpt(E-)の構築

プラスミドpSV2gpt-Cla(実施例1Iで構築)(約20 μ l; 10 μ g)を、水(21 μ l)、ギブコ反応緩衝液#6(5 μ l)、制限酵素PvuII(2 μ l)および制限酵素SphII(2 μ l)と混合した後、37℃で2時間インキュベートした。次いで、反応混合物を0.5% TBEゲル電気泳動にかけ、実質上、実施例1D記載の方法に従ってDEAE 81紙からPvuII/SphII消化ベクターフラグメントを精製した。これら制限部位の3'突出部を充填するために、PvuII/SphII消化pSV2gpt-Claベクター約20 μ lを、10×T4ポリメラーゼ緩衝液(700 mM トリス(pH 7.4)、10

mM MgCl₂、50 mM DTT) 3 μ l、dNTP混合物(各0.5 mMのdATP、dTTP、dCTPおよびdGTP、pH 7.0) 3 μ l、水3 μ l、およびT4 DNAポリメラーゼ(BRL) 1 μ l (5 U)と混合した。この混合物を37℃で15分間インキュベートした後、70℃で10分間加熱した。フェノール抽出およびエタノール沈殿の後、DNAをTE緩衝液5 μ lに再懸濁した。このDNAフラグメント(約1 μ l; 約500 ng)を水10 μ l、5×ライゲーション緩衝液5 μ l、100 μ M ATP 2 μ l、およびT4リガーゼ2 μ lと混合した。室温で2時間インキュベートした後、実質上、実施例1Pの方法に従って、ライゲーション混合物でE. coli HB101細胞を形質転換した。この形質転換体からプラスミドDNAを単離し、SV40エンハンサー領域~0.3 kbの適正な欠失を示すプラスミドをプラスミドpSV2gpt(E-)と命名した。

構築した。プラスミドpSV2neo-Cla(実施例1Pで構築)(約20 μ l; 10 μ g)をギブコ反応緩衝液#3中、制限酵素BamHIおよびHindIIIにより、実質上、上記と同様にして消化した。電気泳動にかけたのち、ネオマイシン耐性付与遺伝子を含む約2.3 kbのHindIII/BamHIフラグメントをDEAE 81紙から単離、精製した。同様に、プラスミドpSV2gpt(E-)も、制限酵素BamHIおよびHindIIIで消化し、電気泳動にかけて大きいベクターフラグメントを精製した。次いで、実質上、上記の節に記載の方法に従ってプラスミドpSV2neo-Claの約2.3 kb HindIII/BamHI neo含有フラグメントをプラスミドpSV2gpt(E-)のHindIII/BamHI消化ベクターフラグメントにライゲートした。E. coli HB101細胞を形質転換し、プラスミドDNAを単離した後、プラスミドpSV2gpt(E-)ベクターバックボーンがプラスミドpSV2neo-Claの約2.3 kb BamHI/HindIII neoフラグメントと結合してなるこれらのプラスミドをpSV2neo(E

ー)と命名した。

C. プラスミドpGCSEMK(E-)およびpGC
EMG(E-)の構築

プラスミドpSV2spl(E-)DNA約10μg (100μl)を水4μl、ギブコ反応緩衝液#1(12μl)、制限酵素ClaI 2μl、および制限酵素BamHI(2μl)と混合し、次いで37℃で一晩インキュベートした。DEAE81紙に電気泳動した後、大きいベクターフラグメントを精製し、TE10μlに再懸濁した。プラスミドpHKCE-10(実施例1Hで構築)約20μl(5μg)を水23μl、ギブコ反応緩衝液#1(5μl)、および制限酵素ClaI 2μlと混合した。37℃で5時間経過した後、反応物をフェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈澱に付した。次いで、消化したDNAを水25μlに再懸濁し、ギブコ反応緩衝液#3(3μl)および制限酵素BamHI 2μlと混合した。37℃で2時間インキュベートした後、消化DNAを電気泳動にかけ、約9.0kbのネズミ可変、ヒ

このBamHI部分消化により、すべての可能なClaI/BamHI制限フラグメントが得られた。0.5%TBEゲル電気泳動にかけ、約12.7kb ClaI/BamHI制限フラグメントをDEAE81紙から精製した。この制限フラグメントは、ネズミ可変、ヒト定常ガンマをコードしている遺伝子を含んでいる。次いで、約12.7kb ClaI/BamHI(部分)制限フラグメントをClaI/BamHI消化プラスミドpSV2spl(E-)とライゲートさせ、E.coli細胞を形質転換した。再度、単離し、制限部位のマッピングを行い、適正な制限地図を有するプラスミドをプラスミドpGCSEMG(E-)と命名した。

D. プラスミドpNCCEMK(E-)およびpNC
EMG1(E-)の構築

実質上、実施例5C記載の方法に従い、プラスミドpSV2neo(E-)DNA約10μg(100μl)を制限酵素ClaIおよびBamHIで消化し、ベクターフラグメントを単離し、精製した。次いで、ネズミ可変、ヒト定常カッパをコードしてい

ト定常カッパをコードしているClaI/BamHI制限フラグメントをDEAE81紙から精製した。次いで、この約9.0kbフラグメントを上記のごとく、ClaI/BamHI消化プラスミドpSV2spl(E-)とライゲートさせ、E.coli細胞を形質転換した。プラスミドを単離した後、正しい制限地図を有するプラスミドをプラスミドpGCSEMK(E-)と命名した。

同様に、プラスミドpHGCE-3'0(実施例10で構築)約40μl(5μg)を水3μl、ギブコ反応緩衝液#1(5μl)および制限酵素ClaI 2μlと混合した。37℃で5時間経過した後、反応物をフェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈澱に付した。次いで、消化したDNAを水26μl、ギブコ反応緩衝液#3(3μl)および制限酵素BamHI 1μlに再懸濁した。37℃で2分間経過後、反応混合物15μlをとり、250μM EDTA 1μlと混合した。37℃で5分間経過後、反応混合物の残り15μlもとり、250μM EDTA 1μlと混合した。

る遺伝子を含む、プラスミドpHKCE-10(実施例5Cで単離)の約9.0kb ClaI/BamHI制限フラグメントを、実質上、実施例5C記載の方法に従い、プラスミドpSV2neo(E-)のClaI/BamHI消化ベクターフラグメントにライゲートさせ、プラスミドpNCCEMK(E-)を構築した。また、実施例5Cの記載に従い、プラスミドpHGCE-3'0の約12.7kb ClaI/BamHI(部分)制限フラグメントをプラスミドpSV2neo(E-)のClaI/BamHI消化ベクターフラグメントにライゲートすることによりプラスミドpNCCEMG1(E-)を構築した。従って、プラスミドpNCCEMG1(E-)は、ネズミ可変、ヒト定常ガンマをコードする遺伝子をSV40エンハンサー-不発現ベクター上に含有するものである。

E. プラスミドpGCHAK(E-)およびpGC
HAG1(E-)の構築

プラスミドpSV2splの代わりにプラスミドpSV2spl(E-)を使用する以外は、実質上、プ

ラスミドpGCHAK (実施例3B)の構築法に従い、プラスミドpGCHAK(E-)を構築した。プラスミドpGCHAG1(E-)は、プラスミドpSV2gplの代わりにプラスミドpSV2gpl(E-)を使用する以外は、実質上、プラスミドpGCHAG1(実施例3A)の構築法に従って構築した。

F. プラスミドpNCEMKG1(E-)の構築

プラスミドpNCEMKG1(E-)は、プラスミドpNCEMG1の代わりにプラスミドpNCEMG1(E-)を使用する以外は、実質上、プラスミドpNCEMKG1(実施例3Q)の構築法に従って構築した。

G. プラスミドpGCHAKG1(E-)の構築

プラスミドpGCHAKG1(E-)は、プラスミドpGCHAG1の代わりにプラスミドpGCHAG1(E-)を使用する以外は、実質上、プラスミドpGCHAKG1(実施例3C)の構築法に従って構築した。

H. プラスミドpGCHAKG1(E-)およびpNCEMKG1(E-)によるSP2/0細胞のト

カーは、当業界周知の方法で1本鎖デオキシオリゴヌクレオチドから合成した。1本鎖デオキシオリゴヌクレオチドは、バイオサーチ(Biosearch) 8700 DNA合成装置[Biosearch社供給、San Raphael C.A.]のような、ホスホリアルミダイト(phosphoramidite)の化学を利用する市販の装置を用いて合成することができる。DNA合成の他の方法も当業者には既知である。1本鎖DNA合成のための、伝統的な改良ホスホトリエステル法は、イタクラら(Itakura)、サイエンス(Science)、198:1056(1977)およびクレアラ(Crea)、プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズUSA、75:5765(1978)により示されている。加えて、特に好ましいDNA合成法は、ヒスイングラ(Hsiung)、ニュクレイック・アシックス・リサーチ、11:3227(1983)およびナラン(Narang)、メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology)、68:90(1980)により開示されている。

トランスフェクション

実施例4に記載の方法に実質上従い、プラスミドpGCHAKG1(E-)をまず、SP2/0細胞にトランスフェクトした。SP2/0細胞をトランスフェクトした後、活性CHAキメラ抗体を発現するSP2/0細胞を実施例5Bに記載の方法によって同定し、これらのクローンをプラスミドpNCEMKG1(E-)でトランスフェクトすることによって、高レベルで2機能性キメラ抗体CEM/CHAの発現を示す細胞を生産した。

実施例7

ヘテロローガスな免疫グロブリン鎖の発現のための高レベル発現システムの構築

A. プラスミドp19HANCHの構築

まず始めに、式：

```
5'-AATTCAGATCTGGTGACCCGCGGTGACGGGCTGCAGATATTGCGGCCGCCATCGATCCA-3'
      |||
3'-GTCTAGACCACTGGCGCCGAGCTGCGCGTCTTATAACCGCGCGCTACCTAGCTTCCA-5'
```

で示されるDNA配列を有するオリゴヌクレオチドポリリンカーを製造することにより、中間体プラスミドp19HANCHを構築した。このリン

約2.5μgの2つのオリゴヌクレオチド鎖を2×アニーリング緩衝液(0.2M NaCl、20mM トリス-HCl(pH 7.8)および2mM EDTA)50μlおよび水50μlと混合した。この反応混合物を70℃で5分間加熱したのち、2本の一本鎖がアニーリングして一本のリンカーセグメントとなるよう、室温まで徐々に放冷した。プラスミドpUC19(ニュー・イングランド・バイオラボ)約1μgを、実質上、既述の方法に従い、制限酵素EcoRIおよびHindIIIで消化した。約2.6kbのベクターフラグメントを精製した後、EcoRI/HindIII消化プラスミドpUC19に、合成したポリリンカーをライゲートさせた。E.coliを形質転換し、再度、プラスミドDNAを単離し、リンカー領域内に適切なHindIII、SspI、PstI、SalIおよびEcoRI部位を有するプラスミドをプラスミドp19HANと命名した。

プラスミドS(-)CHAVLは、最初にBluescriptベクター、M13(-)SK(ストラックジ

ーン)を制限酵素BamHIおよびSstIで消化し、実質上、既述の方法に従い、大きいベクターフラグメントを単離することによって構築した。次いで、プラスミドpMLCH-1を制限酵素BamHIおよびSstIで消化し、ネズCHA可変領域をコードしている遺伝子を含有する約1100bpのフラグメントを単離した。プラスミドpMLCH-1は、Northern Regional Research Laboratory, 1815 North University Street, Peoria, IL 61604に寄託され、そのパーマネント・ストック・カルチャー・コレクションの一部を構成するE.coli K12 HB101/pMLCH-1から好都合に単離することができる。E.coli K12 HB101/pMLCH-1は受託番号NRRL B-18432の下で入手可能である。プラスミドpMLCH-1の約1100bp BamHI/SstI制限フラグメントをBamHI/SstI消化ベクターM13(-)SKとライゲートさせ、得られたプラスミドで実質上、上の実施例記載の方法に従い、E.coliを形質転換した。

ーターを含有する約2.2kb ClaI/SspI制限フラグメントを精製した。別の反応で、プラスミドpGCEMKを制限酵素ClaIおよびSstIIで消化し、約9.4kbベクターフラグメントを単離した。さらに、プラスミドp19HANCHを制限酵素SspIおよびSstIIで消化し、ネズミカッパCHA可変領域をコードする遺伝子を含有している約931bpの制限フラグメントを単離した。3成分ライゲーション反応により、プラスミドpGCEMKの約9.4kb ClaI/SstIIベクターフラグメント、プラスミドpGCEMKのCEMプロモーター含有約2.2kb ClaI/SspI制限フラグメント、およびネズミカッパCHA可変領域をコードする遺伝子を含有しているプラスミドp19HANCHの約931bp SspI/SstII制限フラグメントのすべてを一緒に、同時にライゲートさせ、実質上、既述の実施例の方法に従い、E.coliを形質転換した。プラスミドを単離し、制限マッピングに付した後、制限フラグメントのサイズが適正であるプラスミドをプラスミドpG

再単離および制限マッピングの後、適正な約1100bpのBamHI/SstIフラグメントを含有するプラスミドをプラスミドS(-)CHAVLと命名した。

実質上、既述の方法に従い、プラスミドS(-)CHAVL約1μgを制限酵素PstIで消化した。ネズミCHA可変領域コードしている遺伝子を含有する約900bp PstI制限フラグメントを単離し、制限酵素PstIでポリリンカー領域に切断を施しておいたプラスミドp19HANとライゲートさせた。形質転換、再単離および制限マッピングを行った後、ポリリンカーのHindIII部位と最も近接してCHA遺伝子のJ領域を含有しているプラスミドをプラスミドp19HANCHと命名した。

B. 発現ベクターpGCHAK-2およびpGCHAK-3の構築

実質上、既述の方法に従い、プラスミドpGCEMK(実施例1で構築)約5μgを制限酵素ClaIおよびSspIで消化し、CEMカッパプロモ

CHAK-2と命名した。

同様の方法でプラスミドpGCEMK(E-)(実施例6Cで構築)を制限酵素ClaIおよびSstIIで消化し、約9.2kb制限フラグメント(SV40エンハンサー不含有)を単離した。次いで、このフラグメントをプラスミドpGCEMKのCEMカッパプロモーターを含有する約2.2kb ClaI/SspI制限フラグメントおよびプラスミドp19HANCHの約931bp SspI/SstII制限フラグメントとライゲートさせ、プラスミドpGCHAK-3を構築した。プラスミドpGCHAK-3とプラスミドpGCHAK-2とは、プラスミドpGCHAK-3がSV40エンハンサーを欠如している点でのみ異なる。

C. プラスミドpGCHAKG1-2およびpGCHAKG1-3の構築

プラスミドpGCHAKG1-2は、プラスミドpGCHAKの代わりにプラスミドpGCHAK-2を使用する以外はプラスミドpGCHAKG1の構築法(実施例3C)に従って構築した。同

様に、プラスミドpGCHAKG1-3は、プラスミドpGCHAKの代わりにプラスミドpGCHAK-2を使用し、プラスミドpGCHAG1の代わりにプラスミドpGCHAG1(E-)を使用する以外はプラスミドpGCHAKの構築法（実施例3C）に従って構築した。プラスミドpGCHAKG1-2は、CEMカッパプロモーターから誘導されるCHAキメラ鎖をコードしている遺伝子、およびキメラH鎖CHA-特異的遺伝子を含む。プラスミドpGCHAKG1-3は、CEMカッパプロモーターから誘導されるCHAキメラ鎖をコードしている遺伝子、およびキメラH鎖CHA-特異的遺伝子をSV40エンハンサー-不含有ベクター上に含有している。プラスミドpGCHAKG1-2およびpNCEMKG1でSP2/0細胞をトランスフェクトすると、2機能性キメラCEM/CHAの発現レベルが増加することが示され、プラスミドpGCHAKG1-3およびpNCEMKG1でSP2/0細胞をトランスフェクトすると、これもまた2機能

性キメラCEM/CHAの発現レベルが増加されることが示された。

4. 図面の簡単な説明

第1図はプラスミドpMLCE-10およびプラスミドpHFK-1の制限部位および機能地図、第2図はプラスミドpHKCE-10およびプラスミドpGCEMKの制限部位および機能地図、第3図はプラスミドpMHCE-30およびプラスミドpHGI-Zの制限部位および機能地図、第4図はプラスミドpHGCEM-30およびプラスミドpNCEMG1の制限部位および機能地図、第5図はプラスミドpNCEMKG1の制限部位および機能地図、第6図はプラスミドpMLCH1およびpMLCH1dBの制限部位および機能地図、第7図はプラスミドpGCHAKの制限部位および機能地図、第8図はプラスミドpUCVH1nc-1AおよびpHGI-CHAの制限部位および機能地図、第9図はプラスミドpGCHAG1の制限部位および機能地図、ならびに第10図はプラスミドpGCHAKG1の制限部位および

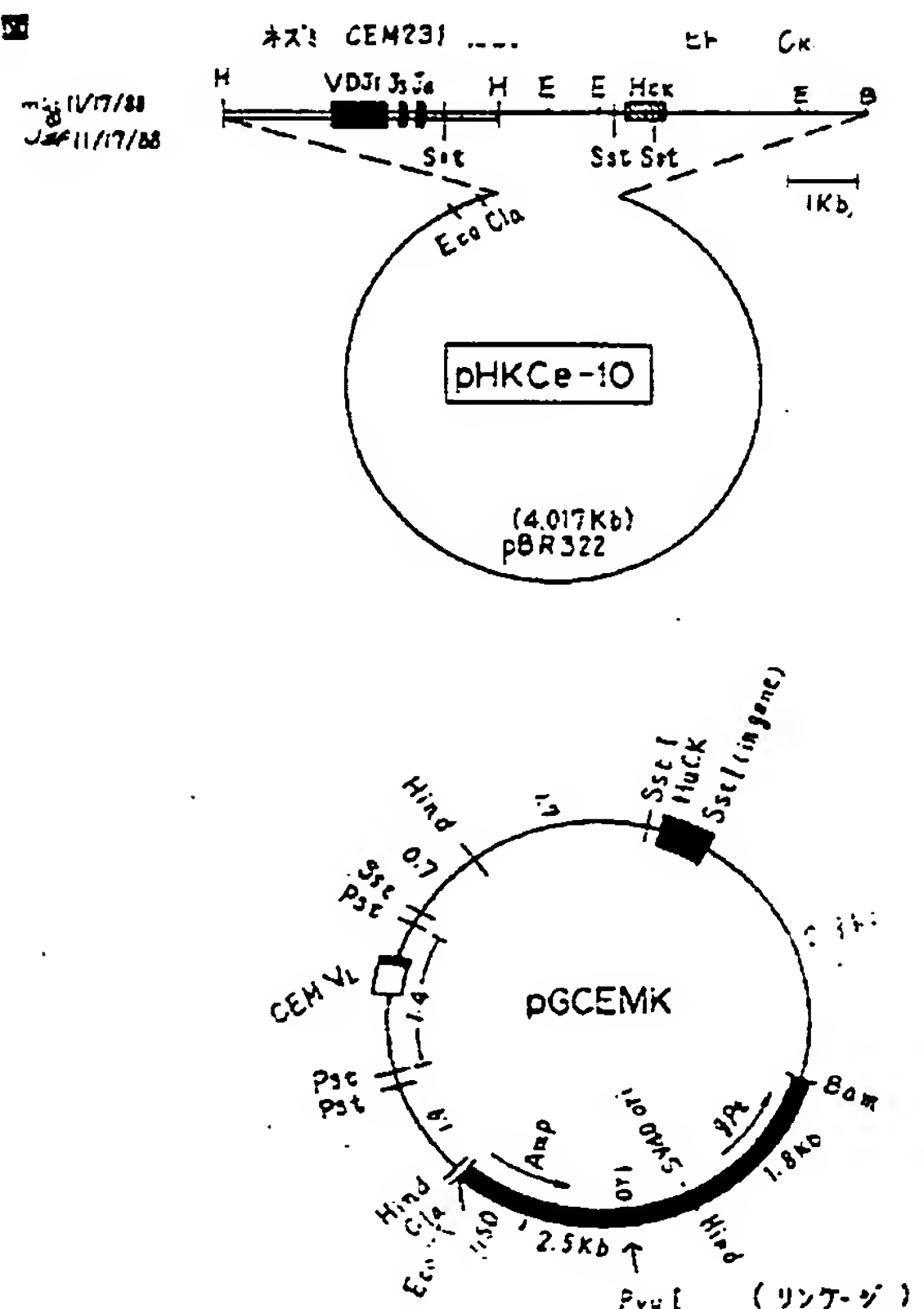
機能地図をそれぞれ示す模式図である。

特許出願人 ハイブリテック・インコーポレイテッド

ド

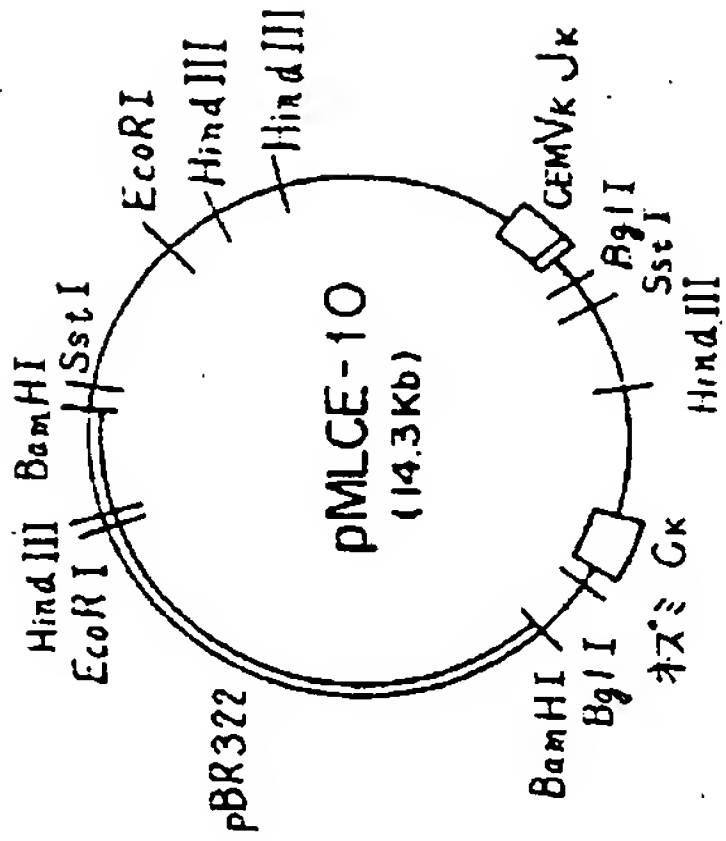
代理人 弁理士 青山 稔 (外1名)

第2図

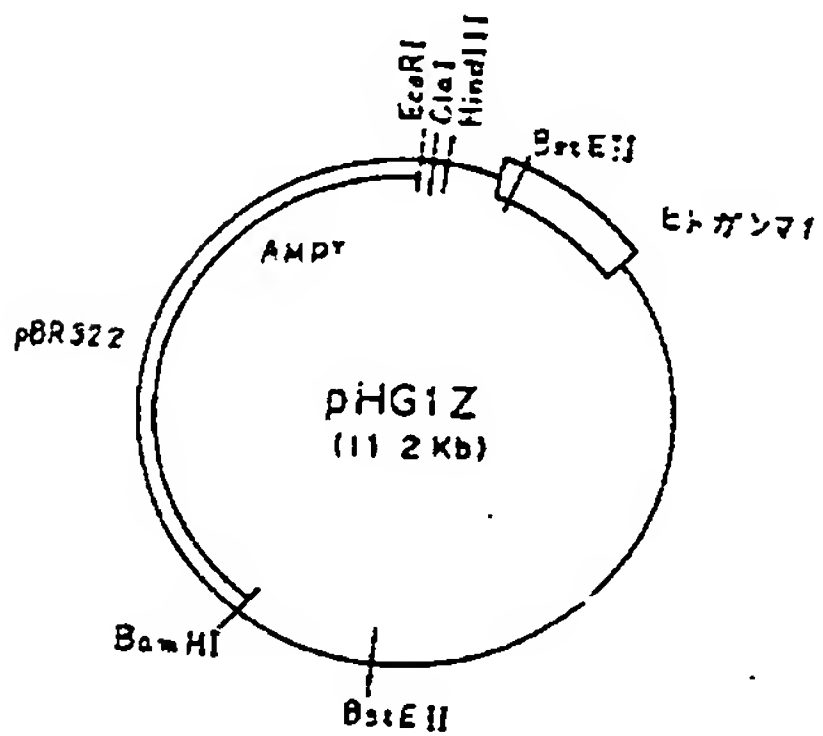
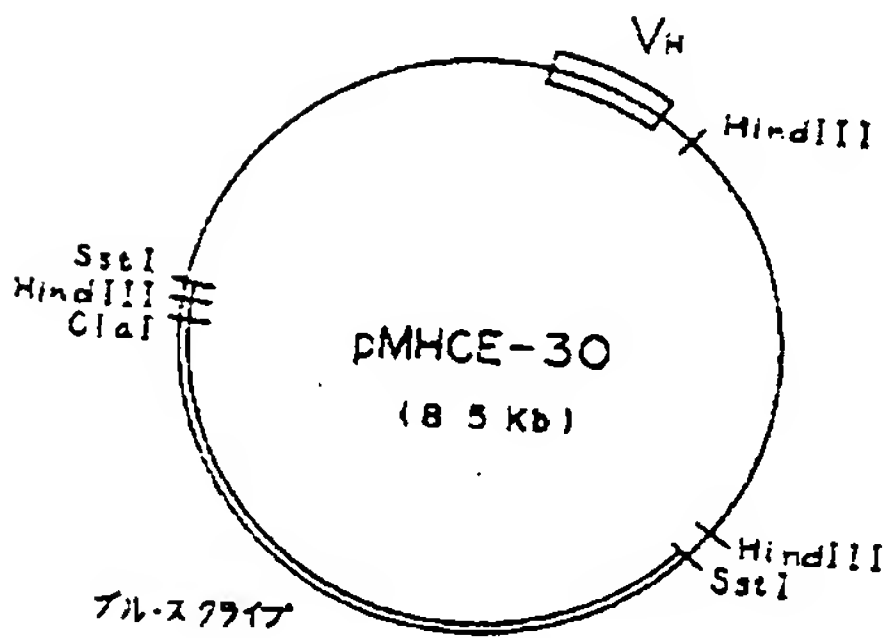


図面の添書(内容に変更なし)

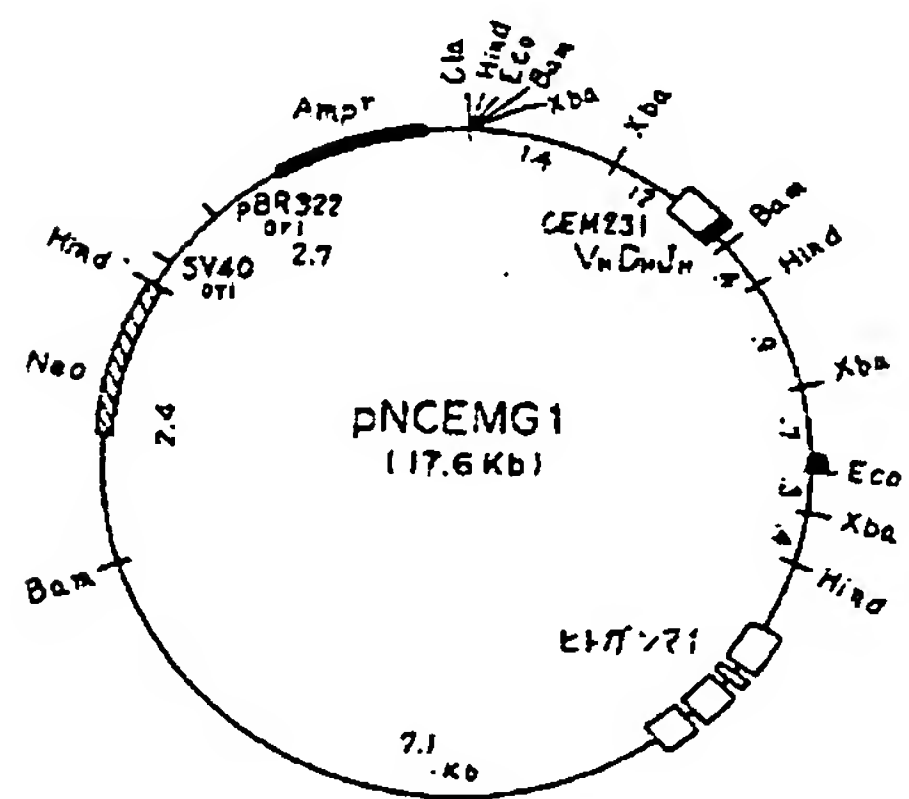
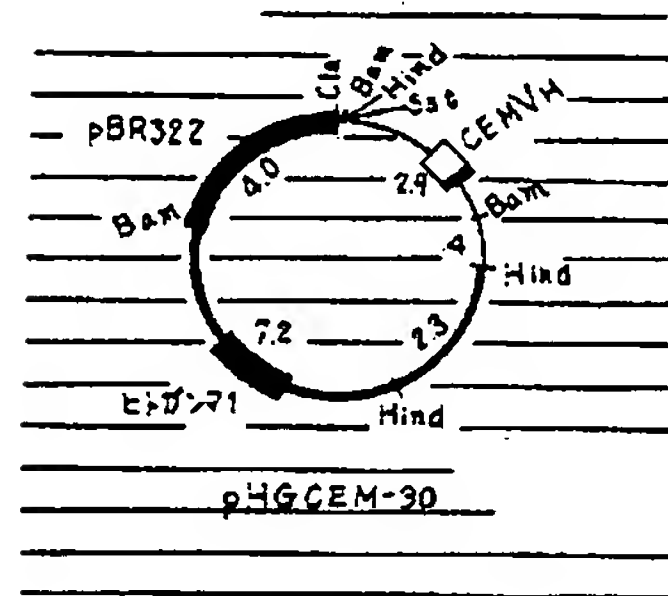
第1図



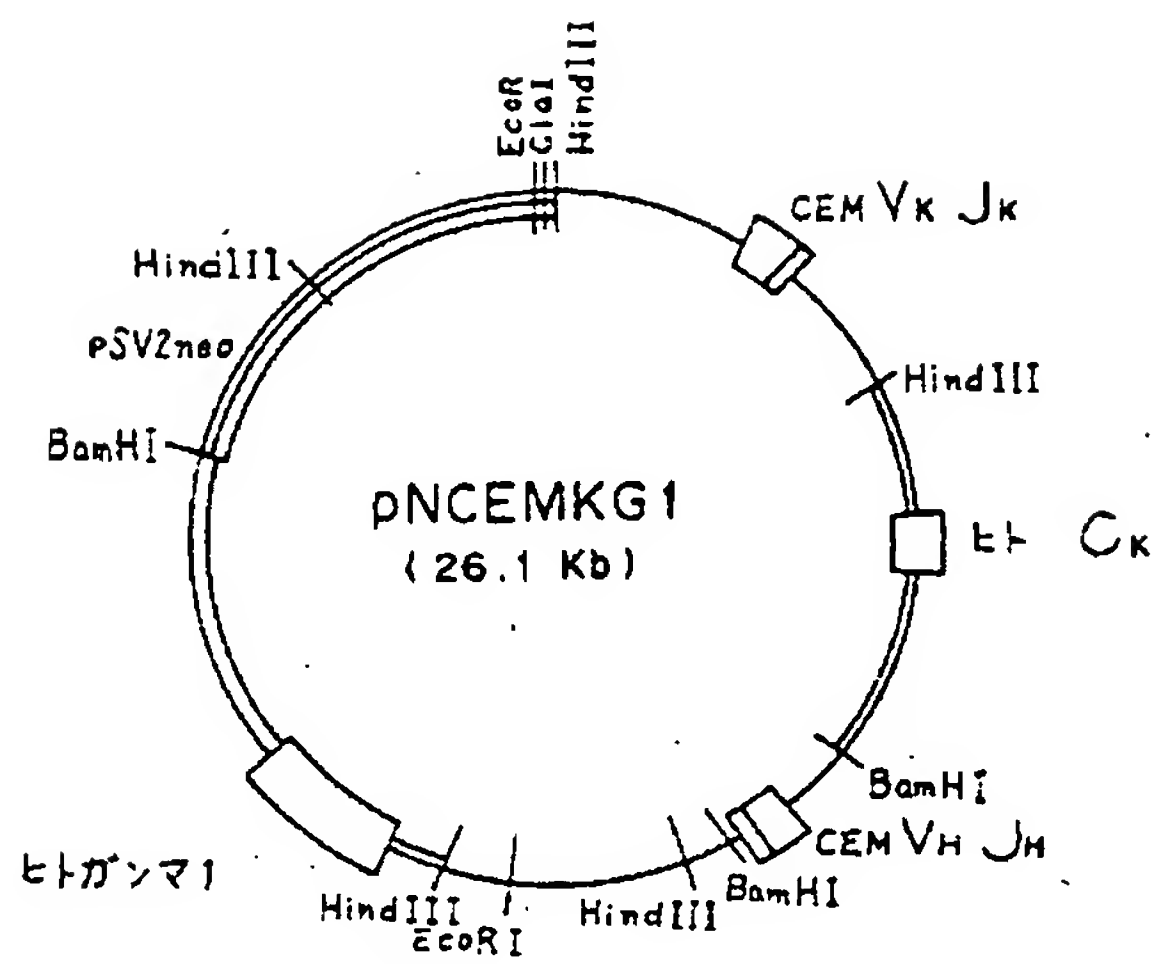
第3図



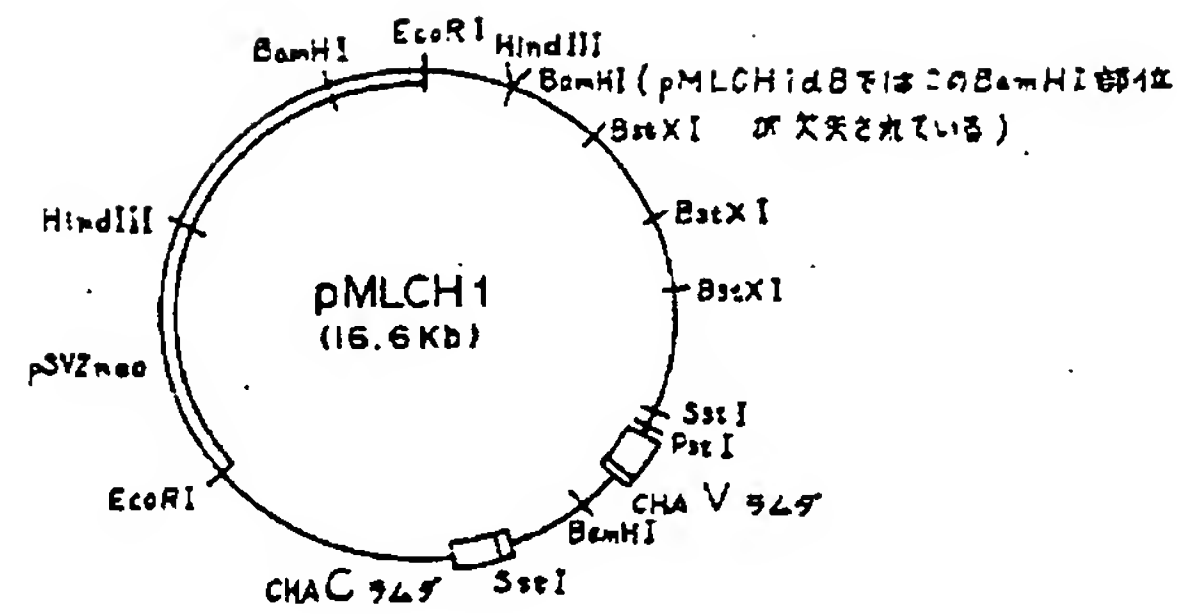
第4図



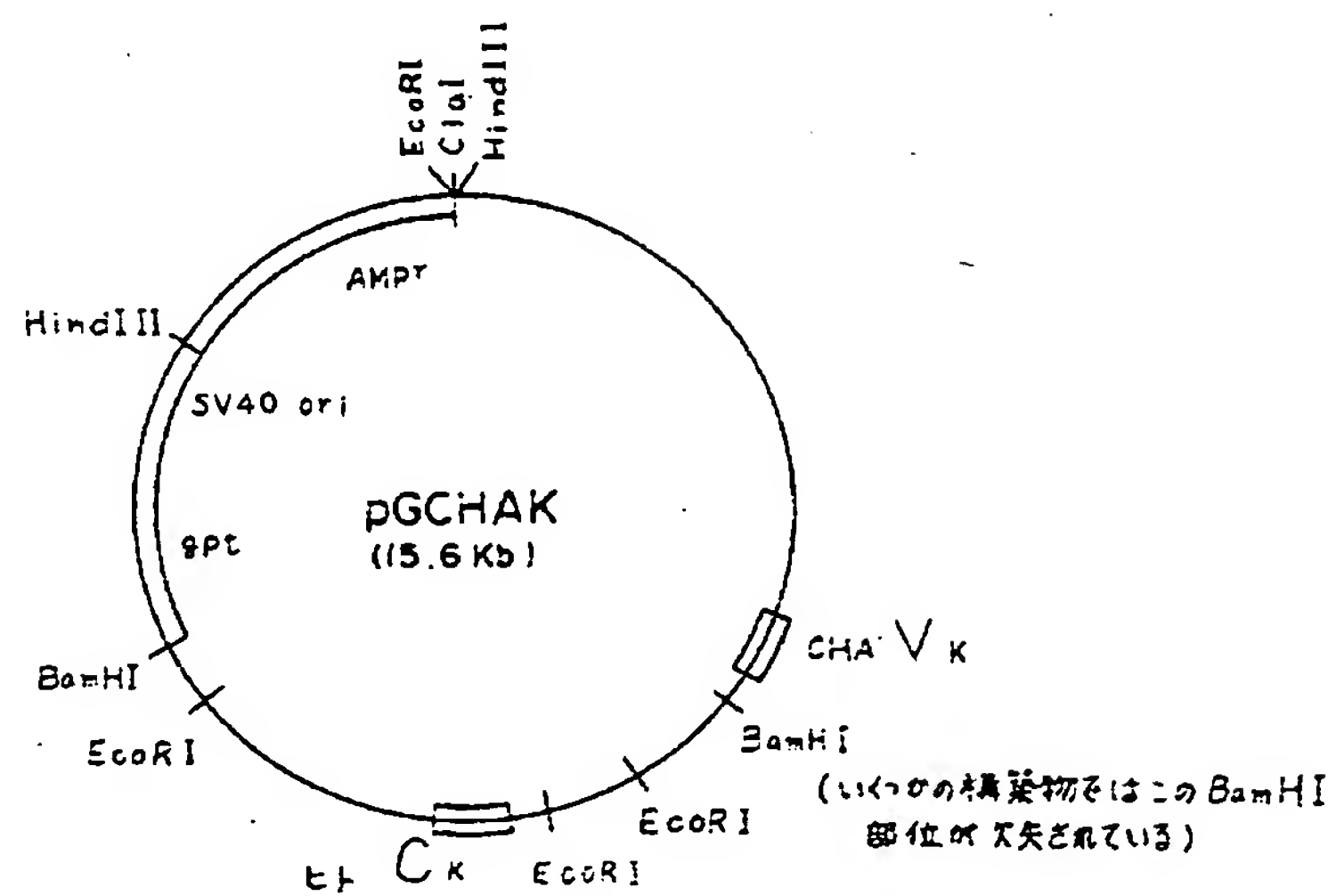
第 5 図



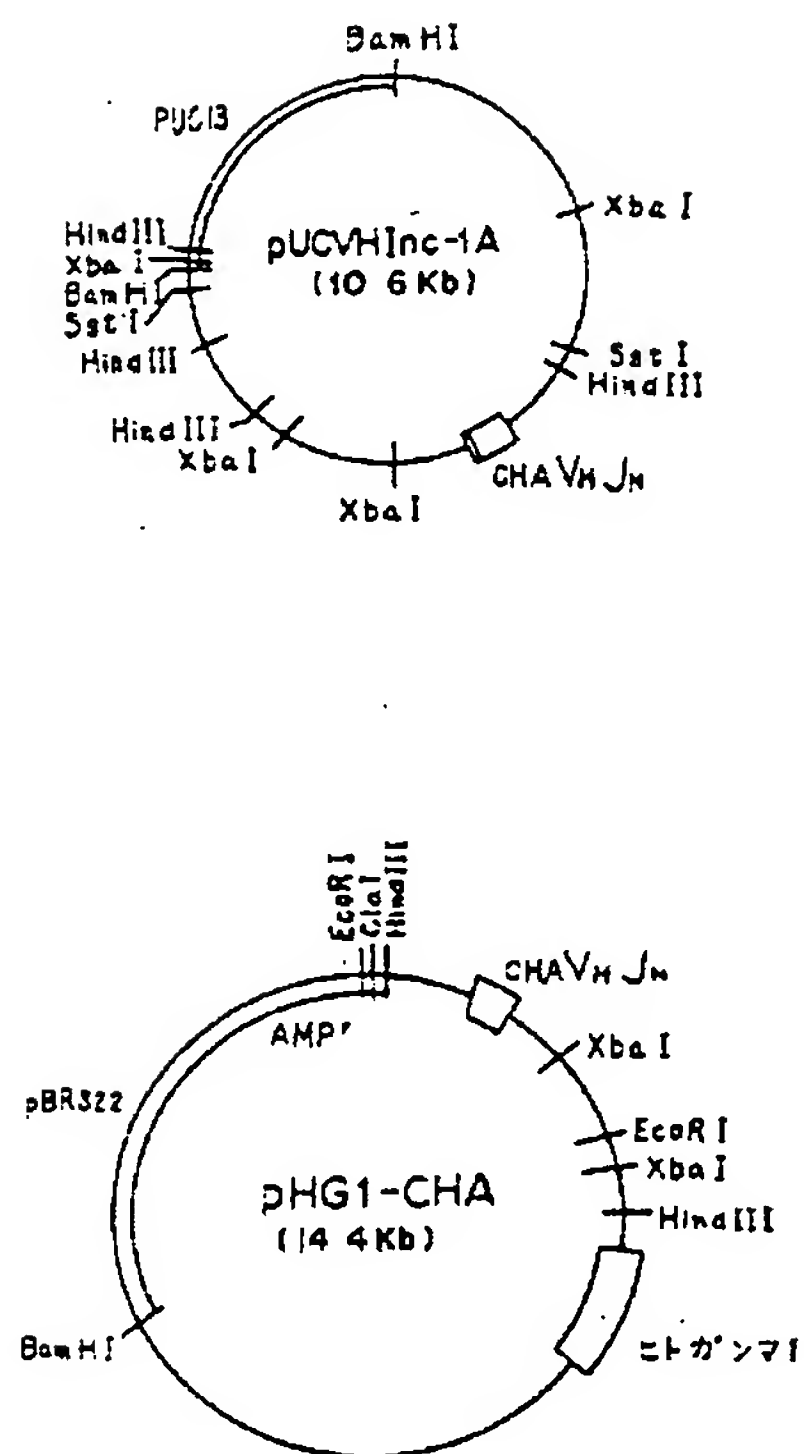
第 6 図



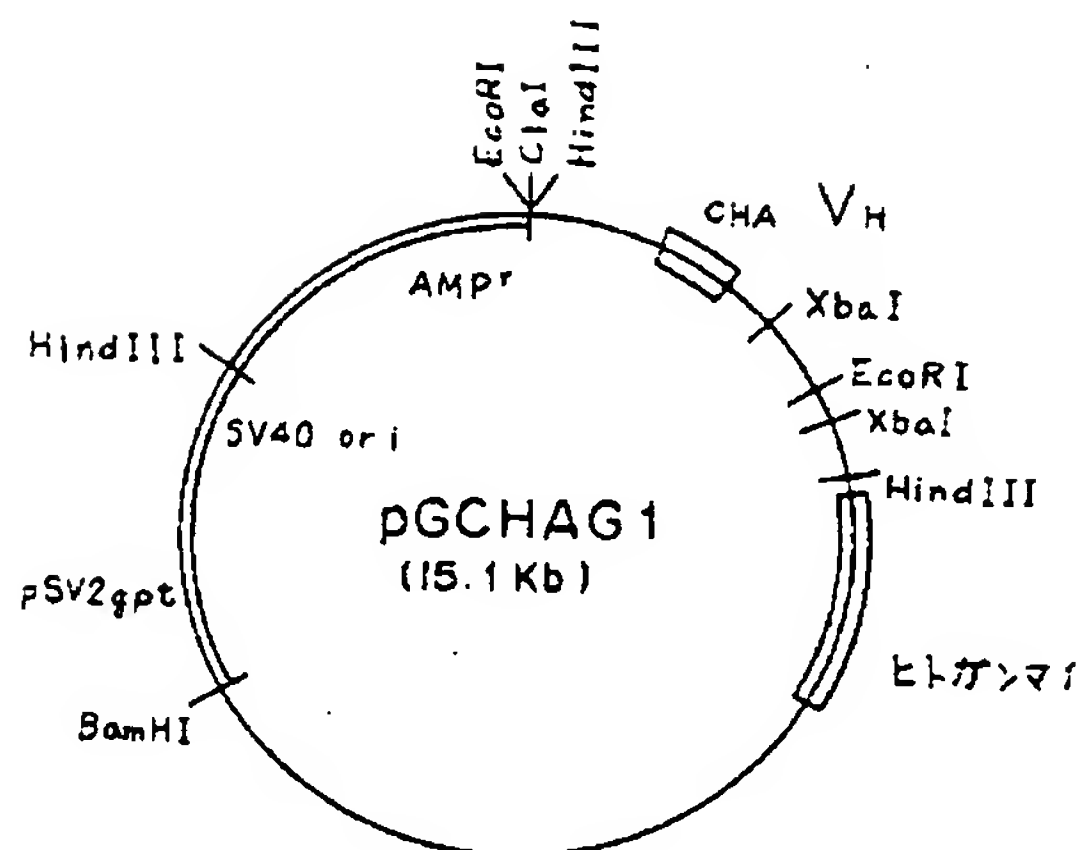
第 7 図



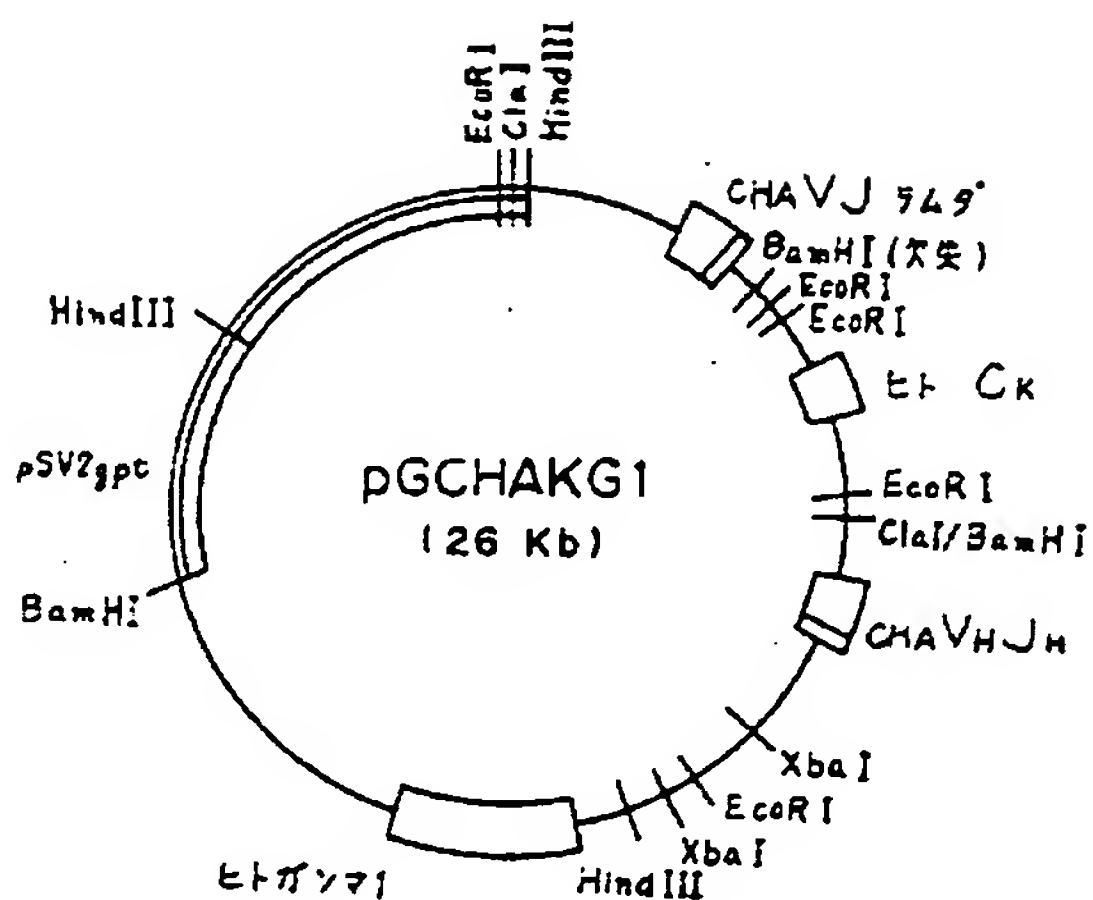
第8図



第9図



第10図



第1頁の続き

⑥Int. Cl.⁸

識別記号

庁内整理番号

C 12 N 5/10
C 12 P 21/08
//(C 12 P 21/08
C 12 R 1:91)

8214-4B

手続補正書

特許庁長官 殿

平成 1 年 6 月 1 2 日

1. 事件の表示

平成 1 年特許願第 5 7 6 7 5 号



2. 発明の名称

2機能性キメラ抗体

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ハイブリテック・インコーポレイテッド

4. 代理人

住所 〒540 大阪府大阪市中央区城見2丁目1番61号
ツイン21 MIDタワー内 電話(06)949-1261

氏名 井理士(5214) 青 山 徹

5. 補正命令の日付 : 平成 1 年 5 月 3 0 日(発送日)



6. 補正の対象 : 図面の全図



7. 補正の内容:

別紙の通り、図面の浄書(内容に変更なし)を提出致します。

なお、今回の手続補正命令のうち、上記以外の点については、別紙の通り手続き済であります。

以 上

書正補手續

特許庁長官殿

平成 1 年 6 月 19 日

1. 事件の表示

平成 1 年特許願第 57675 号



2. 発明の名称

2 機能性キメラ抗体

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ハイブリテック・インコーポレイテッド

4. 代理人

住所 〒540 大阪府大阪市中央区城見2丁目1番61号

ツイン21 MIDタワー内 電話(06)949-1261

氏名 井理士 (5214) 青 山 稔



5. 補正命令の日付：自発

6. 補正の対象：明細書の「発明の詳細な説明」の欄および
図面の全図



7. 修正の内容:

イ) 明細書の「発明の詳細な説明」の欄

以下の箇所に記載の「可変」を「定常」に訂正する。

32頁：下3行目

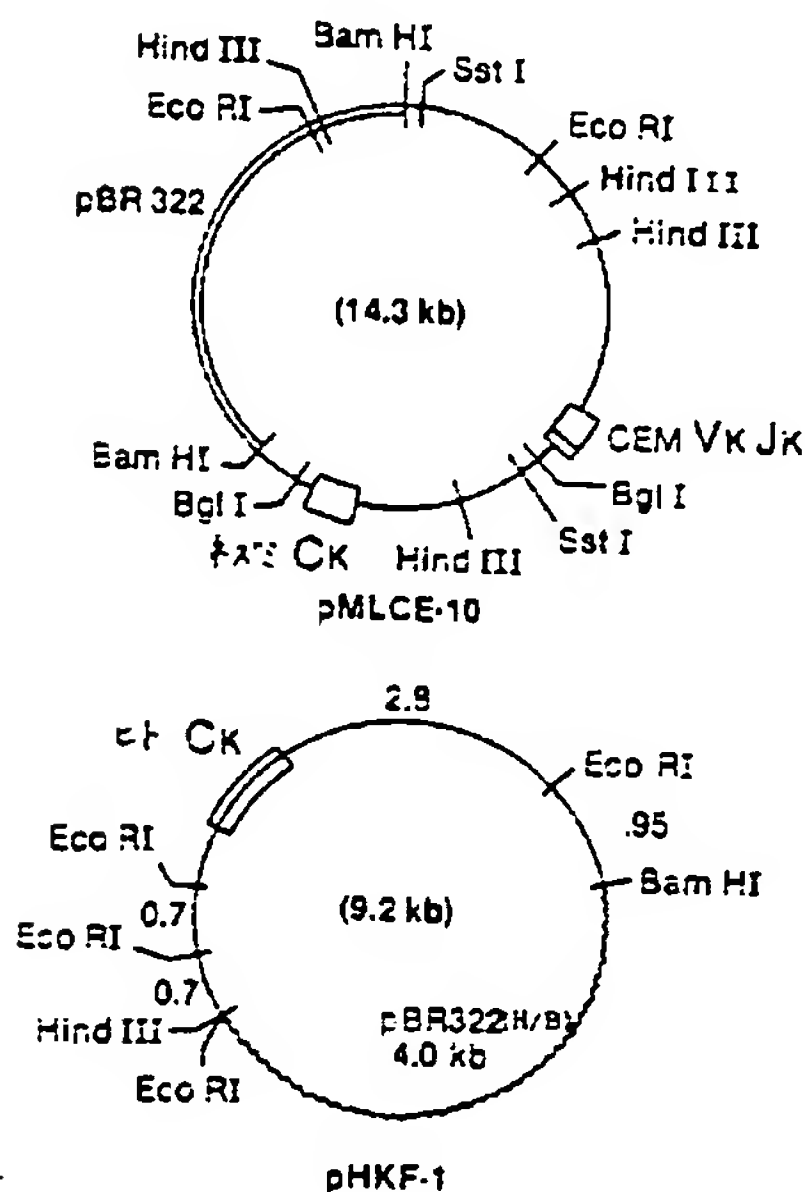
35頁：7行

ロ) 図面の全図

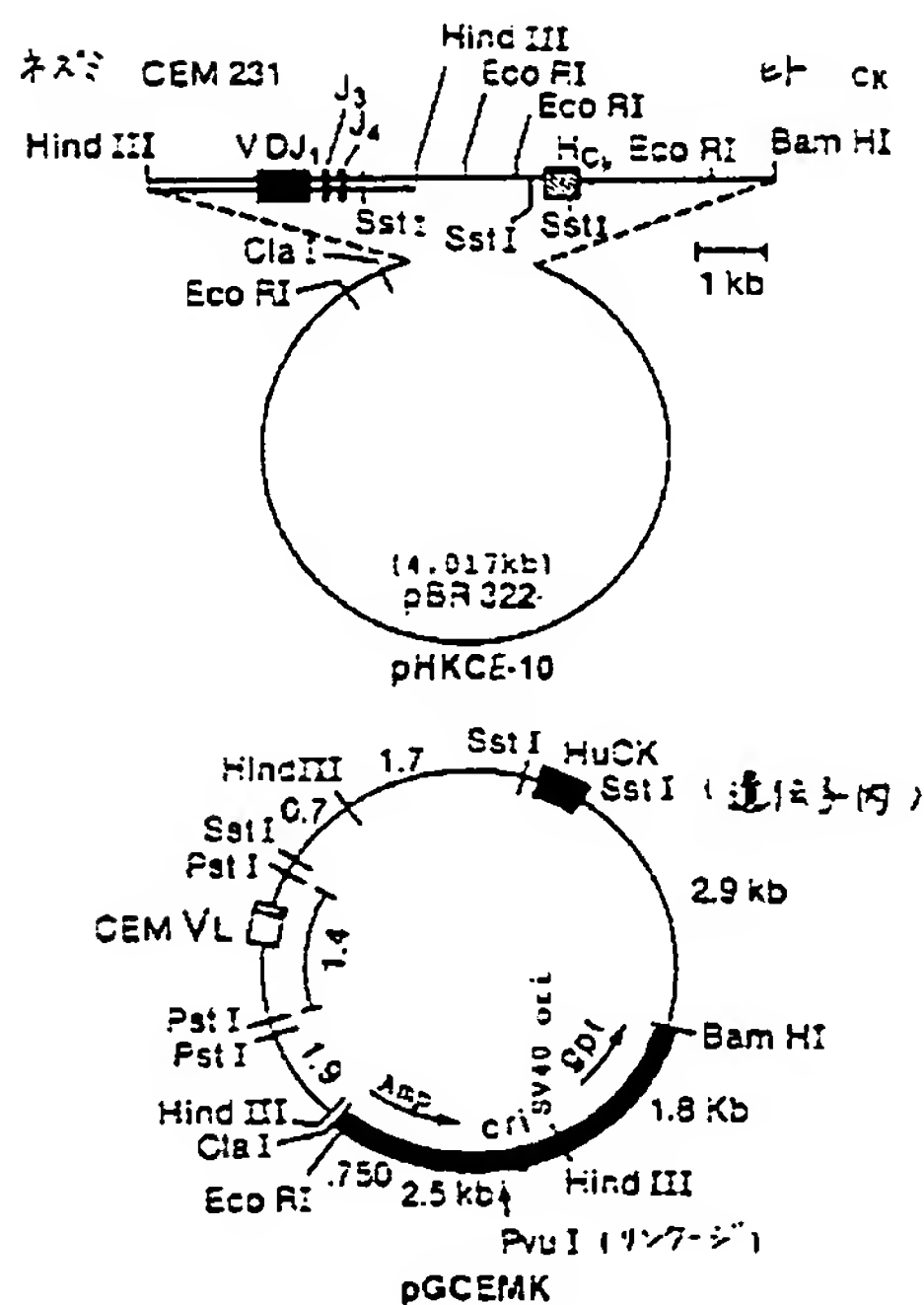
別紙の通り。

以上

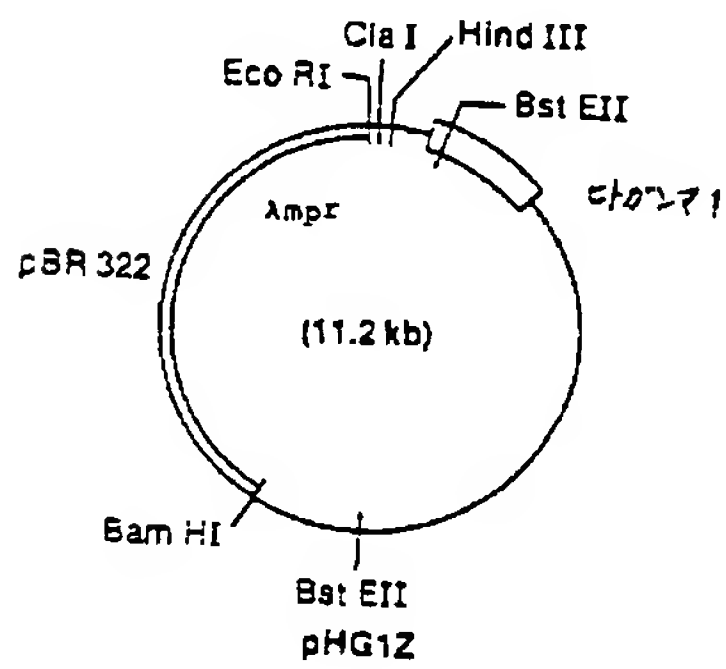
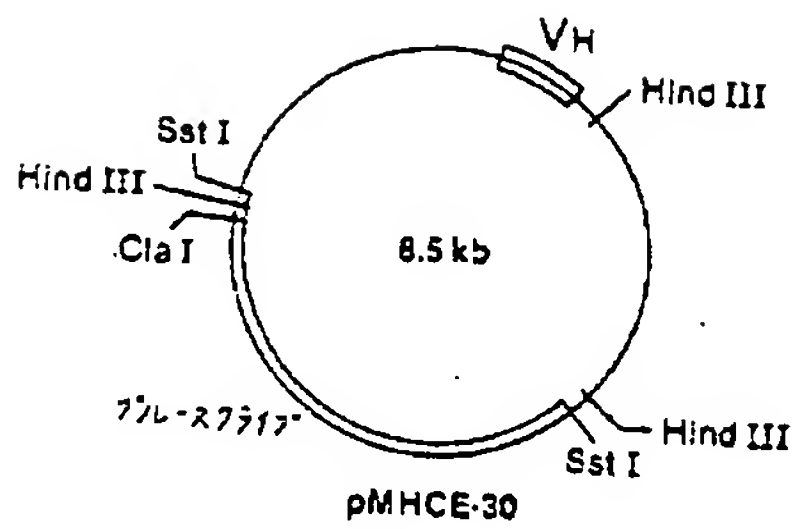
第一圖



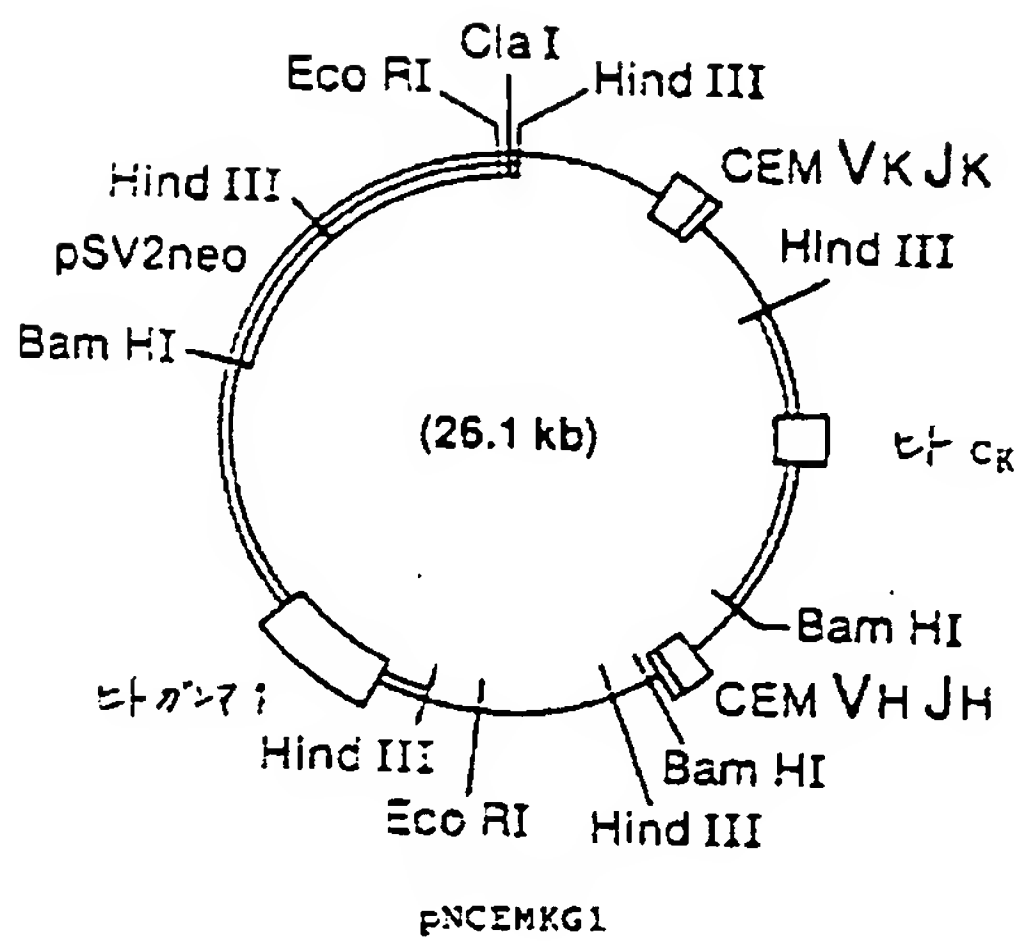
第 2 区



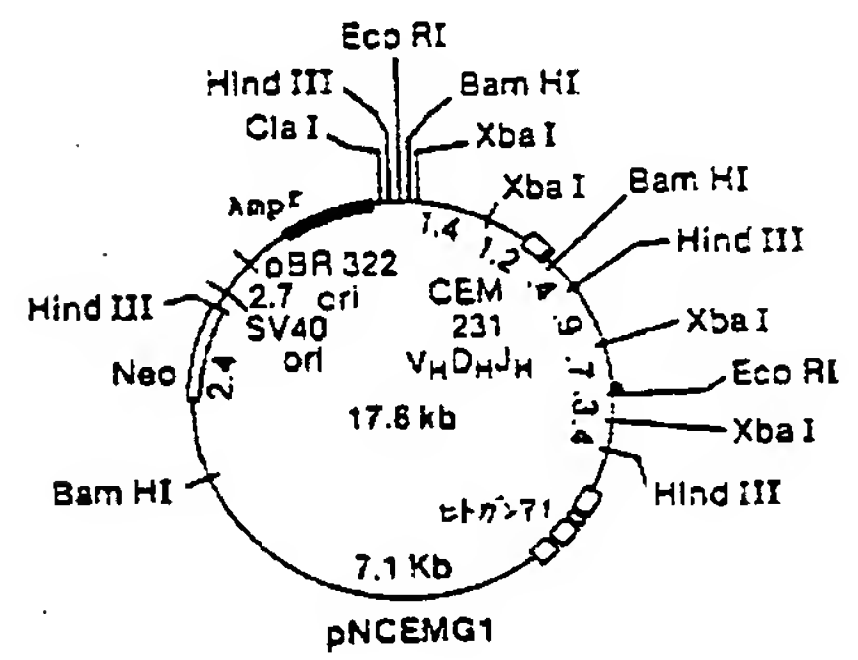
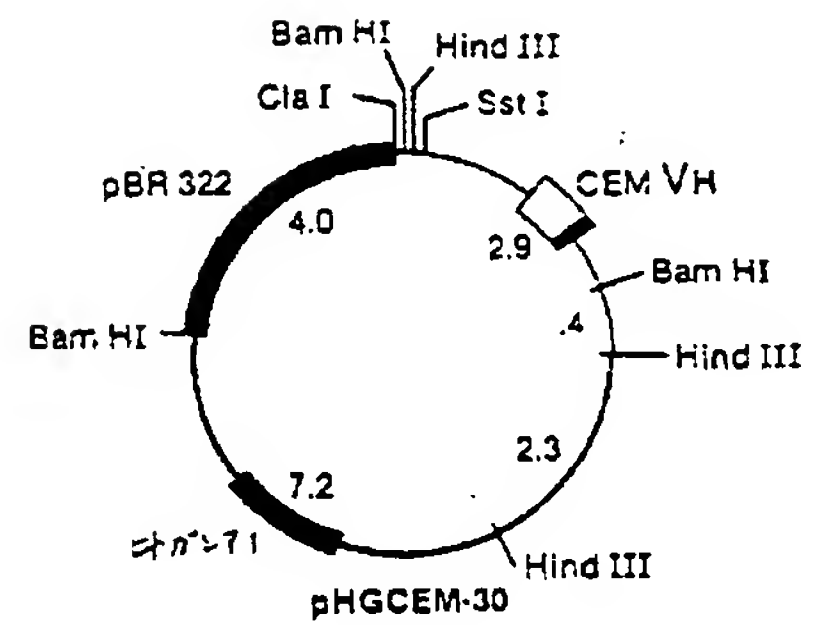
第 3 図



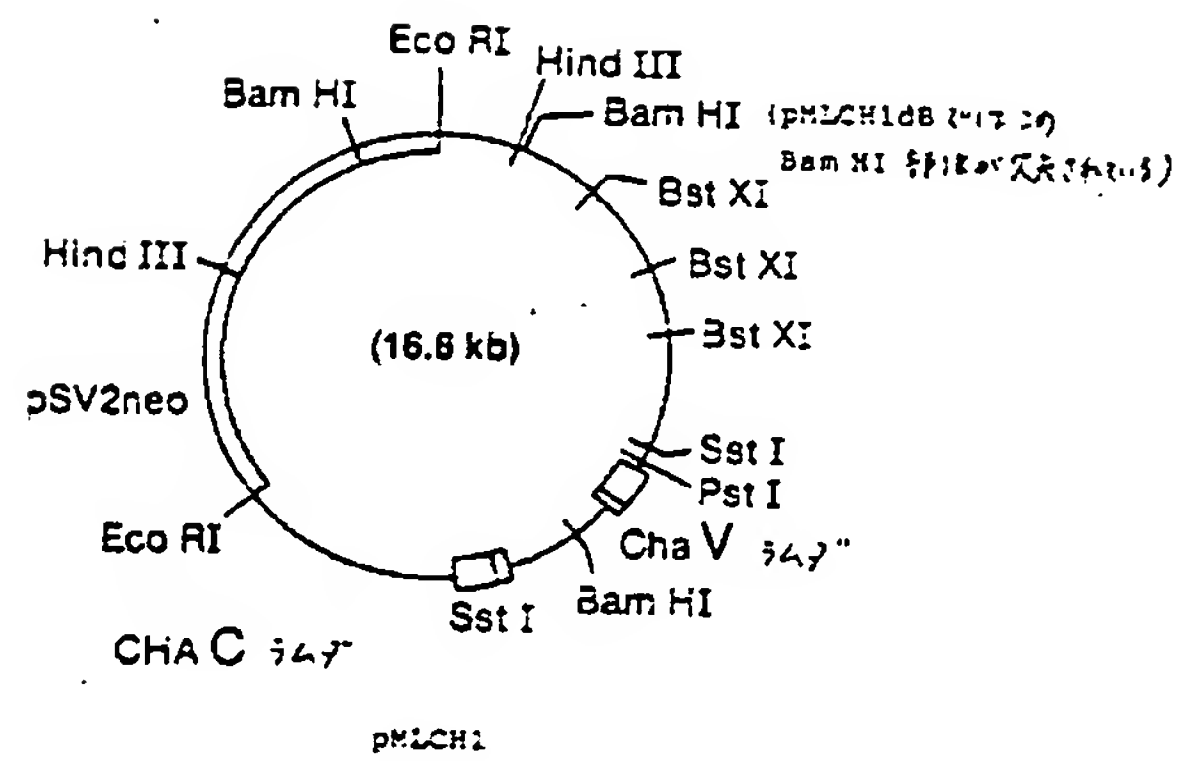
第 5 図



第 4 図

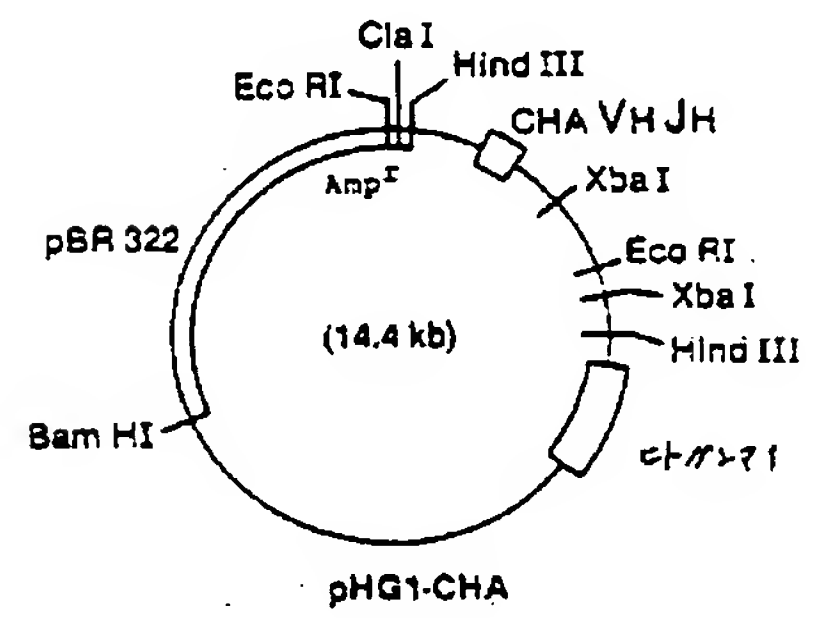
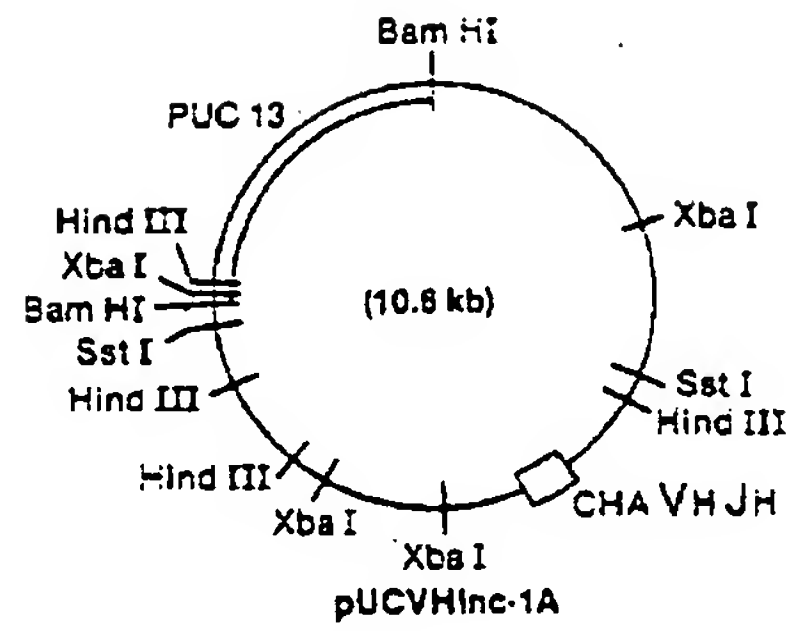
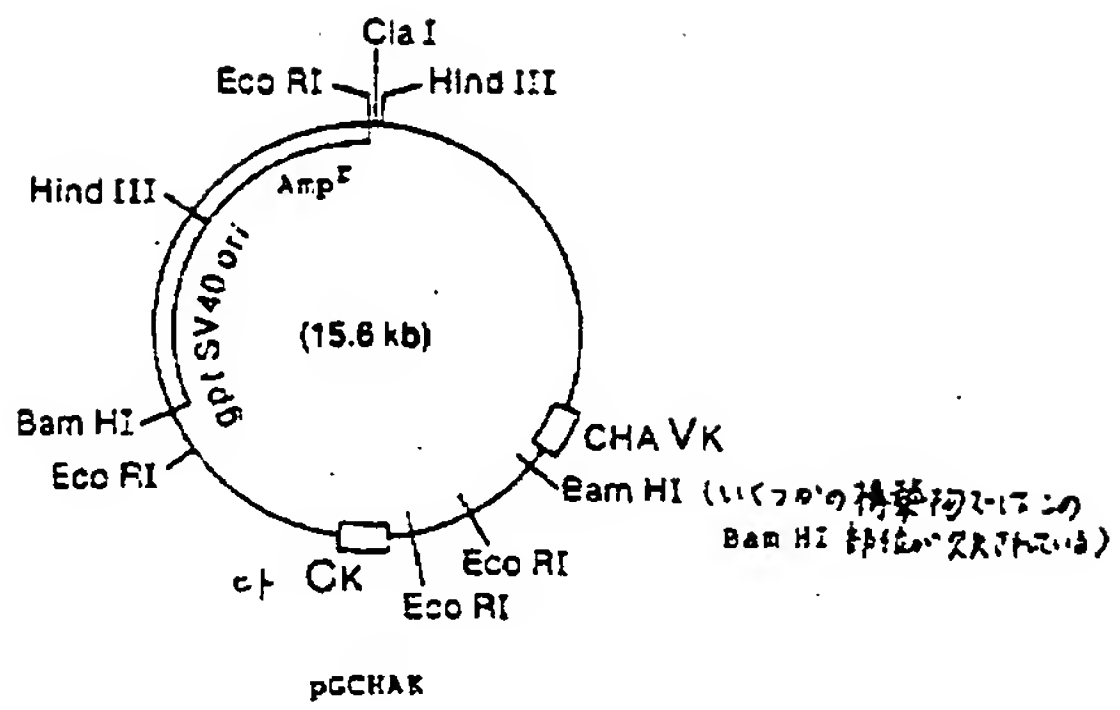


第 6 図



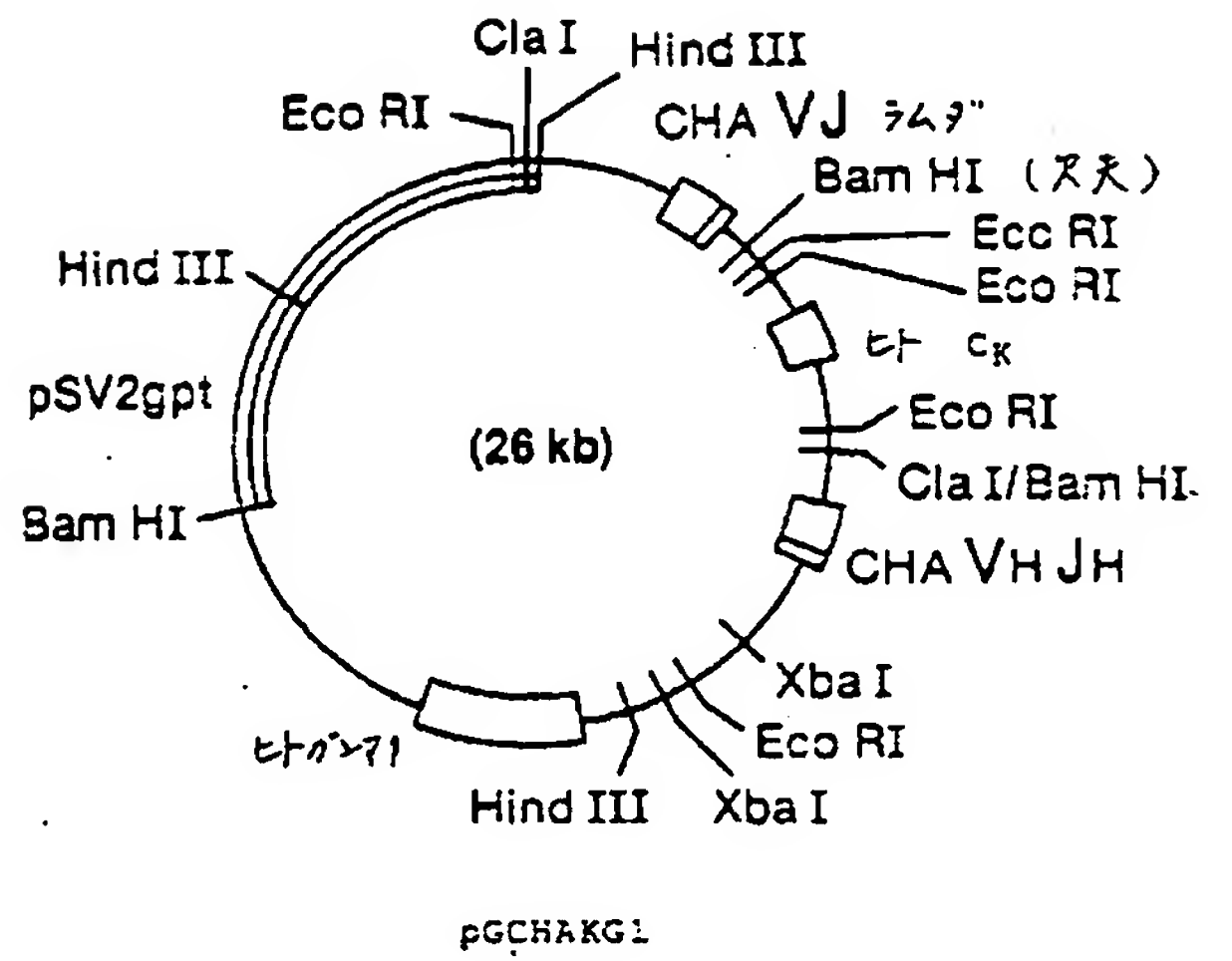
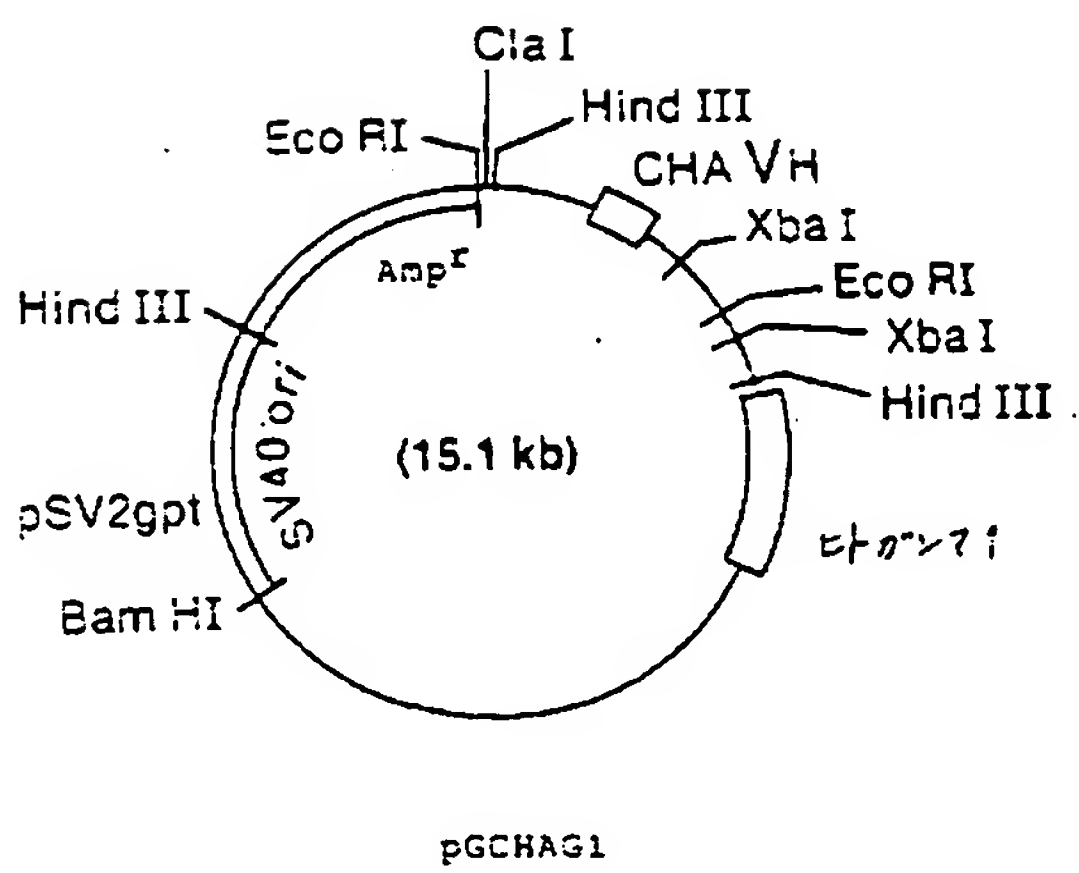
第 8 図

第 7 図



第 9 図

第 10 図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☒ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.